

REAKTIONEN ISOMERER
ortho- UND para-AMINOPHENOLE
MIT HÄMOGLOBIN

Klaus-Gustav ECKERT

1902
—

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 2014774

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. W. Forth

REAKTIONEN ISOMERER ortho- UND para-AMINOPHENOLE

MIT HÄMOGLOBIN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Klaus-Gustav Eckert

aus Berlin

1982

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr. P. Eyer

Mitberichterstatter: Prof.Dr. W. Forth

Dekan: Prof.Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 25. 11. 1982



EINLEITUNG	1
MATERIAL	5
METHODEN	17
ERGEBNISSE	21
1. Reaktionen von 2-Hydroxyphenetidin und 4-Nitrosophenetol mit Hämoglobin	21
1. 1. Ferrihämoglobinbildung durch 2-Hydroxyphenetidin und 4-Nitrosophenetol im Hund	21
1. 2. Ferrihämoglobinbildung durch 2-Hydroxyphenetidin und 4-Nitrosophenetol in gewaschenen Hundeerythrozyten	21
1. 3. Reaktionen von 2-Hydroxyphenetidin mit gereinigtem Menschenhämoglobin	24
1. 4. Ferrihämoglobinbildung durch 2-Amino-7-ethoxy- 3H-phenoxazin-3on	27
1. 5. Einfluß der Hämoglobinkonzentration auf die Geschwindigkeit der 2-Hydroxyphenetidin-Abnahme	27
1. 6. Bindung von (^{14}C)2-Hydroxyphenetidin an gereinigtes Menschenhämoglobin	30
1. 7. Reaktionen von oxidiertem 2-Hydroxyphenetidin mit Thiolen in Inkubaten mit Menschenhämoglobin	30
2. Reaktionen von 2- und 4-Aminophenol mit Hämoglobin vom Menschen	34
2. 1. Ferrihämoglobinbildung durch 2- und 4-Aminophenol	34
2. 2. Schicksal der Aminophenole bei ihrer Autoxidation	34
2. 3. Einfluß der Hämoglobinkonzentration auf die Geschwindigkeit der Aminophenolabnahme	36

2. 4. Reaktionen der Aminophenole mit Hämoglobin-SH-Gruppen	39
2. 5. Einfluß von zugesetzten Thiolen und Aminosäuren auf Reaktionen der Aminophenole mit Hämoglobin	40
2. 6. Kinetik der Abnahme von (^{14}C)2-Aminophenol und der kovalenten Bindung an Hämoglobin sowie der Bildung von (^{14}C)2-Amino-3H-phenoxazin-3on	43
2. 7. Dosisabhängigkeit der 2-Amino-3H-phenoxazin-3on-Bildung sowie der kovalenten Bindung von (^{14}C)2-Aminophenol an Hämoglobin	45
2. 8. Chromatographie des Hämoglobins nach Reaktion mit (^{14}C)2-Aminophenol	45
2. 9. Einfluß von zugesetztem Glutathion auf Reaktionen der Aminophenole mit Hämoglobin	47
2.10. Einfluß von zugesetztem Lysin und Histidin auf die ko- valente Bindung von (^{14}C)2-Aminophenol an Hämoglobin	51
2.11. Kovalente Bindung von (^{14}C)2-Aminophenol an Hämoglobin mit blockierten SH-Gruppen	51
3. Reaktionen von 2- und 4-Dimethylaminophenol mit Hämoglobin von Menschen und Hund	55
3. 1. Ferrihämoglobinbildung durch 2- und 4-Dimethyl- aminophenol	55
3. 2. Schicksal der Dimethylaminophenole in Hämoglobinlösungen ...	55
3. 3. Reaktionen der Dimethylaminophenole mit SH-Gruppen des Hämoglobins	57
3. 4. Einfluß von zugesetztem Glutathion auf Reaktionen von Dimethylaminophenolen mit Hämoglobin	59
DISKUSSION	63
ZUSAMMENFASSUNG	75
LITERATURVERZEICHNIS	78

EINLEITUNG

Toxische und kanzerogene Wirkungen aromatischer Amine werden erst nach ihrer metabolischen Aktivierung zu Aminophenolen oder N-Hydroxyarylaminen beobachtet. Vor der Entdeckung der N-Oxygenierung in vivo hatte man vor allem die 2-Aminophenole für die Kanzerogenität aromatischer Amine verantwortlich gemacht; 4-Aminophenole hingegen waren offensichtlich von geringerer Wirksamkeit.

Besonders gut untersucht ist das Blasenkrebs erzeugende 2-Naphtylamin. Es wird überwiegend zum 2-Amino-1-naphthol metabolisiert (95), einem Metaboliten, der selbst Blasenkrebs hervorruft (8).

1-Naphtylamin ist im Gegensatz dazu nicht sicher (80) kanzerogen, es wird im wesentlichen auch nicht ortho-, sondern para-hydroxyliert. Aus diesen und anderen Befunden entwickelte dann CLAYSON (19) seine Arbeitshypothese, nach der kanzerogene Arylamine erst über eine ortho-Hydroxylierung zu proximalen Kanzerogenen aktiviert werden müssen. Inwieweit die daraus leicht entstehenden ortho-Chinonimine die ultimalen Kanzerogene darstellen, konnte nicht einheitlich geklärt werden. (Übersicht bei ARCOS u. ARCOS, 2).

Diese ortho-Hydroxylierungshypothese wurde verlassen, nachdem die N-Hydroxylierung von KIESE in vivo nachgewiesen wurde (52) und in der Arbeitsgruppe der MILLERs (20) gezeigt werden konnte, daß diese Verbindungsklasse per se oder als Konjugat erheblich stärkere kanzerogene Wirkungen als die ortho-Aminophenole aufweist. (Übersicht bei WEISBURGER, 93, und RADOMSKI, 80).

Ein Brückenschlag zwischen diesen Theorien schien möglich, als BOOTH u. BOYLAND (9) zeigten, daß einige der

N-Hydroxyarylamine eine BAMBERGER-Umlagerung (5) im sauren Harn erfahren können und dabei ortho- und para-Aminophenole bilden (5). Jedoch kommt dieser Mechanismus unter physiologischen Bedingungen nicht allgemein zum Tragen (80, 29).

Neben ihrer kanzerogenen Wirkung sind toxische Auswirkungen der Aminophenole und N-Hydroxyarylamine im Erythrozyten besonders ausgeprägt zu beobachten; schon geringe Konzentrationen können hier zu erheblicher Ferrihämoglobinbildung führen (Übersicht bei KIESE, 53).

Die wirksamsten Ferrihämoglobinbildner sind dabei unter den N-Hydroxyarylaminen zu finden. Diese werden in einer im Mechanismus noch nicht geklärten Kooxidation mit Oxyhämoglobin zu Nitrosoarenen und Ferrihämoglobin oxidiert. Da das entstandene Nitrosoaren durch das Methämoglobin-Reduktase-System wieder zum Hydroxylamin reduziert wird, können eine Vielzahl von Eisenäquivalenten in diesem enzymatischen Kreisprozeß (57) oxidiert werden. Im Gegensatz dazu verläuft die Ferrihämoglobinbildung durch katalytische Mengen an Aminophenolen nicht-enzymatisch: Oxyhämoglobin selbst oxidiert 2- und 4-Aminophenole über Phenoxylradikale zu Chinoniminen. Diese können dann ihrerseits Ferrohämoglobin zu Ferrihämoglobin oxidieren, wobei sie selbst wieder reduziert werden.

Hierbei unterscheiden sich 2- und 4-Aminophenole, denn ortho-Aminophenole bilden im allgemeinen schneller Ferrihämoglobin als para-Aminophenole, erklärbar durch das höhere Redoxpotential und die höhere Reaktivität der ortho-Chinonimine. Hier zeigen sich allerdings auch bemerkenswerte Speziesunterschiede (53).

Über weitere toxische Wirkungen der Aminophenole neben der Ferrihämoglobinbildung berichteten CALDER et al. (16) bei vergleichenden Untersuchungen zur Nephrotoxizität: gerade Verbindungen vom para-Aminophenoltyp er-

wiesen sich dabei als besonders nephrotoxisch bei Ratten; 2-Aminophenol war hingegen nicht, 2-Hydroxyphenetidin nur gering nephrotoxisch. Dieser offensichtliche Einfluß der Stellungsisomerie war überraschend, da beide ortho-Aminophenole wesentlich bessere Ferrihämoglobinbildner waren als das 4-Aminophenol.

Ein derartiger Zusammenhang zwischen Ferrihämoglobinebildung (als Indikator reaktiver Metabolite) und Organtoxizität war mehrfach postuliert worden (76, 81) und wurde auch für das Phenacetin für möglich gehalten (23, 78). Dieses Analgetikum wird nach Deacetylierung zunächst zu Phenetidin und dann weiter zu N-Hydroxyphenetidin und 2-Hydroxyphenetidin metabolisiert. Bei Untersuchungen des para-Phenetidin-Stoffwechsels in vivo (23, 78) und in der isoliert perfundierten Rattenleber (28) war aufgefallen, daß bei Erhöhung der Phenetidindosis überproportional mehr 2-Hydroxyphenetidin gebildet wurde. Deshalb sollte die Fähigkeit der Ferrihämoglobinebildung durch 2-Hydroxyphenetidin genauer überprüft werden.

Orientierende Versuche zeigten, daß 2-Hydroxyphenetidin in Hunde- und auch Menschenblut ein guter Ferrihämoglobinebildner ist. Auffällig war jedoch, daß die Ferrihämoglobinebildung biphasisch verlief, vor allem in Lösungen gereinigten Hämoglobins: nach initial rascher Ferrihämoglobinebildung folgte eine Phase zwar langsamer, allerdings stetig anhaltender Zunahme. Dies war überraschend, da nach den Erfahrungen der Arbeitsgruppe mit 4-Dimethylaminophenol (33, 30, 26, 22) erwartet worden war, daß das ortho-Chinonimin des 2-Hydroxyphenetidins ebenfalls rasch durch Additionen an die SH-Gruppen des Glutathions und Hämoglobins inaktiviert werden würde. Vorversuche mit ^{14}C -markiertem 2-Hydroxyphenetidin ergaben jedoch, daß keine nennenswerte Bindung an Hämoglobin vom Menschen stattfindet und daß auch Glutathion

keinen Einfluß auf Dauer wie auch Ausmaß der Ferrihämoglobinbildung hat. Nachdem orientierende Versuche mit 2-Aminophenol das gleiche Bild ergeben hatten, bestand der Verdacht, daß ortho-Aminophenole andersartig reagierten als ihre para-Isomeren. Deshalb wurden Reaktionen isomerer ortho- und para-Aminophenole mit Hämoglobin in einer eigenen Studie untersucht.

Dabei bot das Verfolgen der Reaktionen in Hämoglobinlösung den Vorteil, sowohl Aktivierungsreaktionen (durch den Häm-aktivierten Sauerstoff) als auch Reaktionen mit biologischen Rezeptoren (Ferrihämoglobinbildung und irreversible Proteinbindung) in einem gut definierten Modellsystem kennenzulernen.

ABKÜRZUNGEN

2-AP	:	2-Aminophenol
4-AP	:	4-Aminophenol
2-DMAP	:	2-Dimethylaminophenol
4-DMAP	:	4-Dimethylaminophenol
GSH	:	Glutathion (reduziert)
GSSG	:	Glutathiondisulfid
Hb	:	Hämoglobin
HbFe ²⁺	:	Ferrohämoglobin
HbFe ³⁺	:	Ferrihämoglobin
HbSH	:	Hämoglobin-SH
HIS	:	Histidin
HPLC	:	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
LYS	:	Lysin
4-NOPT	:	4-Nitrosophenetol
2-OHPT	:	2-Hydroxyphenetidin
pCMB	:	p-Chlormercuribenzoat
TRIS	:	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

MATERIAL

Hunde: Für Methämoglobinbestimmungen wurden Beagle-Hündinnen im Alter von 9 bis 15 Monaten bei einem Gewicht von 9,5 bis 11 kg nüchtern verwendet.

Phosphatpuffer wurde durch Mischen von 0,2 M KH_2PO_4 - und Na_2HPO_4 -Lösungen dem gewünschten pH von 6,6 und 7,4 entsprechend hergestellt.

Vollblut vom Menschen wurde vor Verwendung aus der Cubitalvene frisch entnommen und mit Heparin versetzt.

Für Erythrozytensuspensionen wurde frisch entnommenes, heparinisieretes Blut mit fünffachem Volumen 0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,4) fünfmal gewaschen und das Zellkonzentrat mit demselben Puffer aufgeschwemmt.

Der Hämoglobingehalt von Vollblut und Erythrozytensuspensionen ist jeweils in g Hämoglobin/100 ml angegeben.

Hämolysat aus gewaschenen Menschenerythrozyten wurde im Eisbad durch Beschallung der Zellen (in doppeltem Wasservolumen, sechsmal über 30 s mit 20 kHz, Amplitude = 6 μm) gewonnen. Nach Zentrifugation (20 min/18800 x g) wurde der Überstand dekantiert und das Hämolysat mit 0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,4) auf den gewünschten Hämoglobingehalt eingestellt.

Hundehämoglobinlösung wurde aus heparinisiertem Vollblut von versuchsfreien Beagle-Hündinnen hergestellt. Nach Waschen und Hämolysieren (wie beschrieben) wurde die Hämoglobinlösung für 12 h gegen 0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,4) dialysiert, sodann auf 3 mM HbFe^{2+} eingestellt und abschließend steriltriftriert (0,2 μm Porengröße, Millipore^R, Bedford).

Gereinigtes Menschenhämoglobin:

70 ml frisches Hämolysat (10 g/100 ml) wurden an Sephadex^R G 100 fine (7 x 80 cm) mit 10 mM TRIS-HCl bei pH 8,3 chromatographiert. Die nachfolgende Ionenaustauschchromatographie der hämoglobinhaltigen Fraktionen erfolgte an DE 52-Cellulose (3,8 x 15 cm, äquilibriert mit 10 mM TRIS-HCl, pH 8,3). Eluiert wurde mit einem linearen Chloridgradienten (von 10mM TRIS-HCl, pH 8,3, auf 100 mM TRIS-HCl, pH 7,0). Die hämoglobinhaltigen Hauptfraktionen wurden zur Konzentrierung erneut an DE 52-Cellulose gebunden (3 x 8 cm, äquilibriert mit 10 mM TRIS-HCl, pH 8,3) und mit 0,5 M NaCl in 0,1 M TRIS-HCl (pH 7,0) desorbiert. Die gesamte Reinigung wurde bei 4°C durchgeführt. Die Ausbeute betrug ca. 35 ml gereinigtes Hämoglobin in 10-14%iger Lösung, die vor Verwendung 12 h gegen 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4 dialysiert und mit diesem Puffer auf den gewünschten Hämoglobingehalt eingestellt wurde (in mM HbFe²⁺ angegeben). Dieses Hämoglobin war praktisch frei von Katalase, Superoxid-Dismutase und Glutathion-Peroxidase (27).

Hämoglobin-SH-Gruppen wurden blockiert, indem pCMB in zehnfachem Überschuß mit HbSH 30 min (pH 7,4, Raumtemperatur) reagierte. Danach wurde über Nacht bei 4°C gegen 0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,4) dialysiert. Die Hämoglobinkonzentration wurde mit demselben Puffer eingestellt und die Lösung erneut sterilfiltriert.

4-Nitrosophenetol wurde durch Oxidation von p-Phenetidin-HCl in Anlehnung an die Methode von HIROTA u. ITANO (45) synthetisiert:

50 mMol p-Phenetidin-HCl (in Wasser gelöst) wurden (bei 0°C) zu 1000 ml der folgenden Oxidationslösung gegeben: 62,5 g Kaliumpersulfat wurden mit 62,5 ml konzentrierter Schwefelsäure 1 h lang gerührt, sodann in 5000 ml

Wasser bei 0°C eingerührt; danach wurde mit Kaliumcarbonat auf pH 8,4 und anschließend mit konzentrierter Essigsäure auf pH 6,4 eingestellt.

Die Lösung färbte sich innerhalb von 2 min grün. Nach 5 min wurde der Reaktionsansatz zweimal mit je 500 ml eiskaltem Äther extrahiert. Die Ätherphasen wurden zur Entfernung des restlichen p-Phenetidins mit 1 l 0,1 N Schwefelsäure ausgeschüttelt. Nach Trocknen mit wasserfreiem Natriumsulfat und Abdampfen des Äthers bis auf ca. 10 ml wurde der Kolben auf -20°C gekühlt, wobei das 4-Nitrosophenetol kristallin erstarrte. Zur Reinigung wurde das rohe 4-Nitrosophenetol in Äther aufgenommen und wasserdampfdestilliert. Aus dem fraktioniert aufgefundenen türkisblauen Destillat wurde 4-Nitrosophenetol erneut mit Äther extrahiert. Nach Evaporieren des getrockneten Äthers kristallisierten 34 mMol (68% d.Th.). Nach Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (Hexan:Dichlormethan; 65:35; Rf = 0,43) schien das Präparat zwar rein, jedoch ergab HPLC an μ -Porasil^R (Hexan : Dichlormethan; 65:35; Rvol = 6,0 ml) neben 4-Nitrosophenetol immerhin 13% 4-Nitrophenetol (Rvol = 5,2 ml). Dieser Anteil konnte durch zweimal wiederholte Wasserdampfdestillation auf 0,6% reduziert werden. Schließlich wurden nach Auskristallisieren 17,5 mMol 4-Nitrosophenetol (MG 151) mit dem Schmelzpunkt 33°C erhalten (35% d.Th., s. Anmerkung).

ANMERKUNG:

UEHLEKE (92) verwendete Peressigsäure zur Phenetidinoxidation und berichtete über eine 2-5%ige Ausbeute an reinem 4-Nitrosophenetol. Die Synthese von 4-Nitrosophenetol aus N-Hydroxyphenetidin, das durch Reduktion von 4-Nitrophenetol nach RISING (83) gewonnen wurde, lieferte ebenfalls schlechte, auch schwer reproduzierbare Ausbeuten, die zwischen 5% (92) und 35% (34) lagen. Außerdem enthielten diese so gewonnenen Präparate noch erhebliche Mengen an Nitrophenetol, wie die Analyse mittels HPLC ergab.

Die Extinktionsmaxima der sehr gut ätherlöslichen Substanz wurden bei 238 nm ($\log E = 3,92$), 337 nm ($\log E = 4,26$) und 727 nm ($\log E = 1,97$) bestimmt.

In den in-vitro-Experimenten wurde 4-Nitrosophenetol in Methanol gelöst zugesetzt; Hunden wurde es in Äthanol/Wasser (1/1, v/v) gelöst intravenös verabreicht.

2-Hydroxyphenetidin wurde aus 2-Hydroxyphenacetin (EGA-Chemie, Steinheim) nach salzsaurer Hydrolyse gewonnen:

2,56 mMol 2-Hydroxyphenacetin wurden in 50 ml 1 N Salzsäure suspendiert und 2 h im Wasserbad gekocht. Nicht-hydrolysierte Substanz wurde mit Äther extrahiert und die wäßrige Phase mit 1,57 M tri-Kaliumphosphat-Lösung unter Stickstoff im Eiswasserbad neutralisiert. Danach wurde mit Äther ausgeschüttelt; die Äther wurden vereinigt und mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Durch Einleiten von HCl-Gas wurden im Kältebad (-40°C) silbrigglänzende Kristalle von 2-Hydroxyphenetidin-HCl gebildet. Überschüssiger Äther wurde mit Stickstoff abgeblasen und die Substanz im Exsikkator über Kalziumchlorid bei 4°C aufbewahrt. Die Ausbeute an 2-Hydroxyphenetidin-HCl (MG 189,6) betrug 1,95 mMol (74% d.Th.). Der Schmelzpunkt der Base wurde bei 152°C bestimmt; ($147-149^{\circ}\text{C}$ nach NAMKUNG u. FLETCHER, 75). Absorptionsmaxima hatte 2-Hydroxyphenetidin (in Äther) bei 238 nm ($\log E = 3,84$) und 300 nm ($\log E = 3,55$).

Das Produkt war nach Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (Chloroform : Methanol; 92,5 : 7,5; $R_f = 0,47$) rein, ebenfalls nach HPLC an μ -Bondapak^R C₁₈ (Methanol: Natriumphosphatpuffer, 2 mM, pH 7,4; 68:32; $R_{vol} = 4,2$ ml).

Es entstand allerdings, auch bei Lagerung in der Kälte, langsam 2-Amino-7-ethoxy-3H-phenoxazin-3on als einziges Reaktionsprodukt. Nur Chargen mit weniger als 2% dieses Produkts wurden verwendet.

(^{14}C)2-Hydroxyphenetidin wurde mittels Biosynthese dargestellt, da keine geeigneten radioaktiven Ausgangsstoffe für die in der Literatur beschriebenen mehrstufigen Synthesen zur Verfügung standen.

Das in der Arbeitsgruppe bereits verfügbare (^{14}C)Phenacetin wurde verseift und das (^{14}C)Phenetidin durch rezirkulierende Leberperfusion zum (^{14}C)2-Hydroxyphenetidin-sulfat metabolisiert:

1 mMol (^{14}C)Phenacetin (NEN, Boston, Mass., Auftrags-synthese; U-ringmarkiert, 0,28 mCi/mMol) wurde in 5 ml 1 N HCl 2 h bei 100°C hydrolysiert. Nicht umgesetztes (^{14}C)Phenacetin wurde zweimal mit Äther extrahiert. Nach Neutralisation des wäßrigen Ansatzes wurde (^{14}C)Phenetidin erschöpfend in Äther extrahiert. Dabei wurden 0,97 mMol (^{14}C)Phenetidin erhalten.

Zur Ringhydroxylierung wurden 0,35 mMol (^{14}C)Phenetidin in 120 ml KREBS-HENSELEIT-Puffer 5 h durch eine Rattenleber (7,3 g) rezirkulierend hämoglobinfrei perfundiert (4 ml/g/min, Perfusion nach KAMPFMEYER, 50). 40% der Aktivität fanden sich - nach erschöpfender Ätherextraktion des Perfusats - in der wäßrigen Phase. Nach Gefriertrocknen wurde diese mit 1 N HCl 2 h bei 100°C hydrolysiert. Nach Neutralisation wurde (^{14}C)2-Hydroxyphenetidin mit Essigester extrahiert und durch Zugabe von 1/10 Vol. Essigsäureanhydrid acetyliert. Das entstandene (^{14}C)2-Hydroxyphenacetin wurde mit 0,1 N NaOH reextrahiert und nach Neutralisation der NaOH-Phase mit Äther ausgeschüttelt (Ausbeute von (^{14}C)2-Hydroxyphenacetin: 13% d.Th.).

Geringe Verunreinigungen wurden durch Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (Chloroform : Methanol, 95:5; R_f = 0,48) und durch HPLC an μ -Bondapak^R C₁₈ (Methanol: Wasser, 3:7; Rvol = 11,8 ml) entfernt. Die Ausbeute an reinem (^{14}C)2-Hydroxyphenacetin betrug 8% des bei der Leberperfusion eingesetzten (^{14}C)Phenetidins.

Vor Zugabe zu Hämoglobin wurde (^{14}C)2-Hydroxyphenacetin

hydrolysiert, die salzsaure (^{14}C)2-Hydroxyphenetidin-Lösung sodann mit TRIS neutralisiert. Ebenso wie bei nicht radioaktiver Substanz fanden nur Chargen mit weniger als 2% 2-Amino-7-ethoxy-3H-phenoxazin-3on Verwendung.

2-Amino-7-ethoxy-3H-phenoxazin-3on als Kondensationsprodukt aus 2-Hydroxyphenetidin:

1,95 mMol 2-Hydroxyphenetidin wurden in 500 ml Natriumboratpuffer (0,2 M, pH 8,5) bei 37°C über Nacht inkubiert. Hierbei entstandenes Phenoxazon wurde mit Dichlormethan (dreimal je 500 ml) erschöpfend extrahiert und, nach Evaporieren des Lösungsmittels, im Rotationsverdampfer auskristallisiert. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus heißem Aceton wurden 0,54 mMol (= 55% d.Th.) 2-Amino-7-ethoxy-3H-phenoxazin-3on erhalten, die im Exsikkator (über Kalziumchlorid) aufbewahrt wurden. Der Schmelzpunkt der Substanz wurde mit 256°C bestimmt (257°C nach WILL u. PUKALL, 96).

Das Produkt war nach Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (Chloroform : Methanol, 95:5; R_f = 0,70), ebenso auch nach HPLC an μ -Bondapak^R C₁₈ (Methanol:Natriumphosphatpuffer, 2 mM, pH 7,4, 68:32; Rvol = 9,4 ml) rein.

Die massenspektrometrische Untersuchung bestätigte das errechnete Molekulargewicht von 256. Dabei zeigte die Verbindung Fragment-Ionen bei m/e 229, 228 und 227, die durch Abspaltung von HCN, CO bzw. C₂H₅ erklärt werden konnten. Das IR-Spektrum in KBr zeigte mit dem Absorptionsmaximum bei 6,35 μm , schwächeren Banden bei 6,08, 6,82, 7,19 und 7,55 μm sowie der Carbonylvalenzschwingung bei 6,18 μm die typische Phenoxazonkonfiguration. Auch aufgrund des NMR-Spektrums konnte die Struktur der Verbindung bestätigt werden (in deuterierter Trifluoressigsäure an einem Bruker Spectrospin WH 90 gemessen, Zuordnung der Protonenresonanzen in Tab. 1).

Daten zu UV/VIS-Spektren von 2-Amino-7-ethoxy-3H-phenoxazin-3on in den verschiedenen Lösungsmitteln sind in Tab. 2 wiedergegeben.

2-Amino-7-ethoxy-3H-phenoxazin-3on war in neutraler wäßriger Lösung nur wenig stabil: in 24 h nahm die Extinktion bei 458 nm um 11% ab. In 0,2 M KOH zerfiel die Substanz innerhalb von 5 min und zeigte damit ein dem unsubstituierten 2-Amino-3H-phenoxazin-3on (4, 77) und Cinnabarin (18) ähnliches Verhalten.

Die Instabilität wurde auf die Hydrolyse der 2-Amino-Gruppe der Phenoxazone zurückgeführt (68).

In hohem Maße bestimmte die Wahl des Lösungsmittels die erzielbare Konzentration: die Substanz löste sich gut (bis zu 20 mM) in Dioxan, mäßig in Chloroform, Äther und Aceton, schlechter noch in Äthanol und Methanol. Sie wurde deshalb Hämoglobinansätzen in Dioxan gelöst zugegeben (1/100; v/v).

TABELLE 1

Protonenresonanzen von 2-Amino-7-ethoxy-3H-phenoxazin-3on in deuterierter Trifluoressigsäure

Zuordnung	ppm	Intensität	Kopplungskonstante
H - 9	7,65	1, d	9 Hz
H - 8	7,25	2, m	
H - 6			
H - 4	6,93	1, s	
H - 1	6,77	1, s	
CH ₂	4,29	2, q	7 Hz
CH ₃	1,55	3, tr	7 Hz

TABELLE 2

Absorptionsbanden von 2-Amino-7-ethoxy-3H-phenoxazin-3on im UV- und sichtbaren Spektrum

Lösungsmittel	Wellenlängen in nm; () = log E; s = Schulter									
Äther	221 (4,62)	248s (4,35)	272s (4,04)	286s (3,85)	411s (4,24)	439 (4,38)				
Dichlormethan	228 (4,63)	250s (4,35)	274s (3,98)	285s (3,81)		450 (4,38)				
Methanol	226 (4,65)		274s (4,08)	285s (3,94)		453 (4,33)				
0,2 N methanol. HCl	229 (4,59)		270s (4,06)	295s (3,81)		446s (3,93)	483s (4,11)	540 (4,19)		
0,2 N methanol. KOH	229s (4,59)		274s (4,11)	285s (3,95)		453 (4,33)				
0,2 N HCl						502 (4,13)		537 (4,13)		
0,05 N HCl						482 (4,11)		537 (4,02)		

2- und 4-Aminophenol wurden von Merck, Darmstadt, bezogen.

(¹⁴C)2-Aminophenol wurde aus (¹⁴C)Anilinhydrogensulfat in Anlehnung an die Methode von BOYLAND et al.(12) synthetisiert:

2,45 µMol (¹⁴C)Anilinhydrogensulfat (von Amersham-Buchler, Braunschweig; U-ringmarkiert, 102 mCi/mMol) wurden in 0,5 ml Wasser gelöst und mit 0,05 ml 2 N KOH versetzt. Unter ständigem Rühren wurden 0,3 ml Kaliumpersulfatlösung (0,3 g / 6 ml) innerhalb von 2 h zugetropft und der Ansatz sodann zentrifugiert. Nicht umgesetztes Anilin wurde aus dem Überstand erschöpfend mit jeweils gleichem Äthervolumen extrahiert. Die wäßrige Phase (22 % der eingesetzten Aktivität) wurde mit HPLC präparativ fraktioniert (durch Ionenpaarchromatographie an µ-Bondapak^R C₁₈, Methanol:Tetrabutylammoniumphosphat, 10 mM, 40:60). Die eluierten (¹⁴C)2-Aminophenolsulfatesterhaltigen Fraktionen (Rvol = 6,4 ml) wurden vereinigt und, nach Einengen am Rotationsverdampfer, zur Entfernung des Tetrabutylammoniumphosphats an Sephadex^R LH 20 (1 x 200 cm, Wasser) chromatographiert. Die Ausbeute an radiochemisch reinem (¹⁴C)2-Aminophenolsulfatester betrug 9% des eingesetzten (¹⁴C)Anilinhydrogensulfats. (Dieser Syntheseweg scheint trotz der geringen Ausbeute brauchbar, wenn billiges Ausgangsmaterial und geringer Zeitaufwand berücksichtigt werden).

Vor Verwendung wurde (¹⁴C)2-Aminophenolsulfatester mit inaktivem 2-Aminophenol versetzt, bei 100 °C in konzentrierter Salzsäure 30 min hydrolysiert und anschließend neutralisiert.

Dieses Präparat (5 µCi / µMol) enthielt zu 91% reines (¹⁴C)2-Aminophenol (UV, HPLC, Dünnschichtchromatographie); neben 7% nicht hydrolysiertem Sulfatester lagen 2% bereits als 2-Amino-3H-phenoxazin-3on vor. Der Sul-

fastester verhielt sich bei Inkubation mit Hämoglobin, Aminosäuren und Thiolen inert; die Ausbeuten der ¹⁴C-markierten Verbindungen 2-Aminophenol und 2-Amino-3H-phenoxazin-3on sowie der säurelöslichen Metaboliten wurden den Verunreinigungen entsprechend korrigiert.

2-Amino-3H-phenoxazin-3on als Kondensationsprodukt aus 2-Aminophenol:

100 mMol 2-Aminophenol autooxidierten in 200 ml Natriumboratpuffer (0,2 M, pH 8,5) im offenen Becherglas unter ständigem Rühren über Nacht. Nach mehrmaliger Extraktion der schmutzigbraunen wäßrigen Lösung mit Dichlormethan kristallisierte nach Evaporieren im Rotationsverdampfer ein rotbrauner Niederschlag, der in Methanol das von MUSSO u. MATTHIES (69) beschriebene dreigipflige Spektrum von 2-Amino-3H-phenoxazin-3on ergab.

Mit 0,1 N Salzsäure wurde nicht vollständig umgesetztes 2-Aminophenol aus ätherischer Lösung ausgeschüttelt. Nach Evaporieren des Äthers wurde der Rückstand in heißem Aceton aufgenommen; beim Abkühlen kristallisierte 2-Amino-3H-phenoxazin-3on. Nach Umkristallisation wurden 10,6 mMol (21% d.Th.) mit einem Schmelzpunkt von 257°C - nach NAGASAWA et al. 255 - 257°C (72) - erhalten.

Die Verbindung war nach Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (Chloroform : Methanol, 95:5; R_f = 0,64) und HPLC an μ -Bondapak^R C₁₈ (Methanol : Wasser, 8:2; R_{vol} = 4,5 ml) rein. Auch massenspektrometrisch wurde das errechnete Molekulargewicht von 212 mit einem zu dem von PFEIFER et al. (77) angegebenen identischen Fragmentierungsmuster bestätigt.

Eine weitere Bestätigung der Struktur der Verbindung ergaben die Zuordnungen der Protonenresonanzen anhand des NMR-Spektrums (Tab. 3).

TABELLE 3

Protonenresonanzen von 2-Amino-3H-phenoxazin-3on (gemessen in deuterierter Trifluoressigsäure)

Zuordnung	ppm	Intensität
H - 9,8,7,6	7,55 - 7,73	4
H - 4	6,89	1
H - 1	6,78	1

Die Extinktionsmaxima von 2-Amino-3H-phenoxazin-3on in Äther wurden bei 228 nm ($\log E = 4,46$), 407 nm ($\log E = 4,37$) und 426 nm ($\log E = 4,39$) bestimmt.

In anderen Lösungsmitteln (Äthanol, Methanol, Chloroform) sowie nach Säure-/Alkalizugabe waren die spektroskopischen Daten mit den bei MUSSO u. MATTHIES (69) sowie NAGASAWA et al. (73, 72) angegebenen identisch; das IR-Spektrum (in KBr) zeigte ebenfalls dieselben Schwingungsbanden wie bei MUSSO et al. (70).

2-Amino-3H-phenoxazin-3on war bis zu Konzentrationen von ca. 20 mM gut löslich in Dioxan; hierin gelöst wurde es auch zu Hämoglobinansätzen (1/100; v/v) gegeben. Schlechter noch als bei dem 7-substituierten Phenoxazon war die Löslichkeit in Äther, Aceton, Methanol und auch Chloroform.

2-Dimethylaminophenol wurde von RENNER nach der Methode von HUISGEN et al. (47, 48) synthetisiert (bräunlich-

rosafarbene Kristalle, MG 137; Extinktionsmaximum in Äther bei 280 nm, $\log E = 3,46$). Die Substanz war nach Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (Chloroform: n-Hexan:Essigsäureäthylester, 45:45:10; $R_f=0,75$) rein.

(^{14}C)2-Dimethylaminophenol lag als Hydrochlorid (NEN, Boston Mass.; U-ringmarkiert, $2,67 \mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$) vor und wurde vor Verwendung mit inaktivem 2-Dimethylaminophenol gemischt: es war nach Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (s. 2-Dimethylaminophenol) radiochemisch zu 98% rein.

4-Dimethylaminophenol wurde als Hydrochlorid verwendet. (Synthese der Farbwerke Hoechst, Frankfurt/M.).

(^{14}C)4-Dimethylaminophenol (Farbwerke Hoechst, Frankfurt/M.; U-ringmarkiert, $9 \mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$) wurde vor Verwendung mit inaktivem 4-Dimethylaminophenol gemischt. Die radiochemische Reinheit des Gemisches betrug über 99%.

Aminosäuren (Histidin, Lysin) und 4-Hydroxymercuribenzoessäure-Natriumsalz stammten von Serva, Heidelberg.

Glutathion (oxidiert und reduziert), NADPH, Glutathion-Reductase und Glyoxalase I wurden von Boehringer, Mannheim, bezogen, Methylglyoxal von Carl Roth, Karlsruhe.

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Alufolien mit Kieselgel 60 F_{254} mit einer Schichtdicke von 0,2 mm von Merck, Darmstadt, verwendet.

Für Säulenchromatographien wurden verwendet: Sephadex^R G 75 fine, G 100 fine sowie LH 20 (Deutsche Pharmacia, Freiburg) und DE 52-Cellulose (Whatman, Wiesbaden).

Alle anderen verwendeten Chemikalien (p.a.-Qualität) waren von Merck (Darmstadt).

METHODEN

Alle in vitro-Versuche wurden bei 37°C (im Wasserbad) durchgeführt, sofern keine andere Temperatur genannt ist. Puffer und hämoglobinhaltige Lösungen wurden vor dem Beginn einer Reaktion 5 min bei gleicher Temperatur vorinkubiert.

Ferrihämoglobin wurde anhand der Extinktionszunahme nach Zugabe von Kaliumcyanid bei 550 nm nach KIESE (52) bestimmt. Vollblut und erythrozytenhaltige Suspensionen waren vorher vollständig hämolysiert.

Gesamthämoglobin wurde als Methämoglobin nach Oxidation mit Kaliumferricyanid gemessen.

Hämoglobingehalte in fraktionierten Eluaten nach Säulenchromatographien wurden anhand der Extinktionsdifferenz der mit Cyanhämiglobinlösung (Asid, Unterschleissheim) versetzten Probe gegen reines Cyanhämiglobinreagenz bei 540 nm bestimmt (49).

Konzentrationen der nicht radioaktiv vorliegenden Verbindungen wurden nach Ätherextraktion spektrophotometrisch nach den in Tab. 4 angegebenen Daten ermittelt.

(¹⁴C)2-Aminophenol-Bestimmung mit Hilfe der Isotopenverdünnungsmethode:

Aliquote von 0,5 ml wurden mit 0,01 ml einer 1%igen inaktiven 2-Aminophenol-Lösung (in Methanol) versetzt und sofort mit 2,5 ml Äther extrahiert. Nach Einengen des Äthers und Chromatographie an Kieselgel (Chloroform : Methanol, 95 : 5) wurde die 2-Aminophenol enthaltende Bande abgekratzt und mit 3 ml Äther eluiert. Aus der photometrisch bestimmten 2-Aminophenol-Menge und der Radioaktivität errechnete sich der Anteil des markier-

TABELLE 4

Absorptionsbanden und Extinktionskoeffizienten (Äther)

Verbindung	E max (nm)	log E
4-Nitrosophenetol	333	4,22
2-Hydroxyphenetidin	300	3,55
2-Amino-7-ethoxy-3H-phenoxazin-3on	439	4,38
2-Aminophenol	290	3,51
2-Amino-3H-phenoxazin-3on	426	4,39
4-Aminophenol	308	3,42
2-Dimethylaminophenol	280	3,46
4-Dimethylaminophenol	247	4,07

ten 2-Aminophenols in der Probe.

(¹⁴C)2-Amino-3H-phenoxazin-3on wurde ebenfalls mit Hilfe der Isotopenverdünnungsmethode bestimmt:

Aliquote von 0,5 ml wurden mit 0,02 ml einer 0,2%igen Lösung von nicht radioaktivem 2-Amino-3H-phenoxazin-3on (in Dioxan) versetzt und mit 2,5 ml Äther extrahiert. Nach Einengen des Äthers wurde an Kieselgel chromatographiert (Chloroform : Methanol, 95 : 5). Die gelbe Farbstoffbande wurde abgekratzt und mit 3 ml Äther eluiert. Aus der photometrisch bestimmten Menge von 2-Amino-3H-phenoxazin-3on und der Radioaktivität wurde der Anteil von (¹⁴C)2-Amino-3H-phenoxazin-3on in der Probe berechnet.

Diese Technik war bis zu Farbstoffkonzentrationen von 0,25 mM verlässlich. Bei höheren Konzentrationen und

langen Inkubationszeiten (24 h) ließ sich (^{14}C)2-Amino-3H-phenoxazin-3on nur durch wiederholtes Ausschütteln in gleicher Weise wie der inaktive Farbstoff extrahieren.

Radioaktivitäten in ungefärbten Lösungen wurden mit einem Dioxan-Naphthalin-POPOP-PPO-Szintillator nach BRAY (15 ml/Probe), in hämoglobinhaltigen oder sonstigen gefärbten Lösungen sowie Zellsuspensionen nach Auflösung mit Soluene^R 100 (1,5 ml/ 0,1-0,5 ml Probe; Packard Instruments, Frankfurt/M.) und Entfärben mit 30% Wasserstoffperoxid (0,5 ml) mit Insta-Gel^R (15 ml; Packard) in einem Tri-Carb^R 2660 Szintillationszähler (Packard) gemessen. Die Ergebnisse wurden für Ausbeute (externer Standard) und Hintergrundstrahlung korrigiert. Auf Dünnschichtplatten wurde Radioaktivität mit einem Scanner (Typ II) der Fa. Berthold, Wildbad, gemessen.

Glutathion-Bestimmung:

Aliquote der Probe wurden mit gleichem Volumen 1 M Perchlorsäure gefällt, der Überstand mit 1/5 Volumen tri-Kaliumphosphat-Lösung (1,57 M) neutralisiert. Ausgefällenes KClO_4 wurde abzentrifugiert.

Im Überstand wurde GSH als S-Lactyl-Glutathion nach Reaktion mit Methylglyoxal in Gegenwart von Glyoxalase I bei 240 nm bestimmt (nach RACKER, 79). Unmittelbar danach wurde GSSG durch Messung des NADPH-Verbrauchs in Gegenwart von Glutathion-Reduktase bei 340 nm bestimmt (nach RALL u. LEHNINGER, 82).

Lysin und Histidin in proteinhaltigen Inkubaten wurden nach Fällung der Proteine mit 0,6 M Trichloressigsäure mit einem Multichrom^R M 4327 Aminosäuren-Analysator von Beckman, München, unter Verwendung von Pierce-Pufferlösungen (Rockford, Ill.) bestimmt.

Hämoglobin-SH-Gruppen wurden anhand der Extinktionszu-

nahme bei 250 nm nach Reaktion mit p-Chlormercuribenzoat bestimmt (nach BOYER, 10). Die bei dieser Wellenlänge bereits vorhandene hohe Eigenabsorption von pCMB-Reagenz und Hämoglobin wurde durch Einsetzen von Küvettenpärchen (1 cm SD / Küvette) in Referenz- und Probenstrahl des Photometers kompensiert. Ein Küvettenpärchen enthielt jeweils 3 ml der Hämoglobinprobe (0,085 g Hb / 100 ml, über Nacht gegen 0,2 M Phosphatpuffer, pH 7,4, dialysiert) und 3 ml Phosphatpuffer (0,2 M, pH 7,4). Titriert wurde durch Zugabe einer 1 mM pCMB-Lösung (in 10 µl-Schritten) zu Puffer (Referenz) und Hämoglobin (Probe).

Extinktionen wurden an einem PMQ III Photometer (Zeiss, Oberkochen) bestimmt: Spektren im UV-/VIS-Bereich wurden an einem Cary 219 (Varian, Palo Alto, Cal.), im IR mit einem IR-20 A Gitterspektrometer (Beckman Instruments, München) aufgenommen.

Hochdruckflüssigkeitschromatographien wurden mit Säulen und Geräten von Waters (Milford, Mass.) durchgeführt: Säulen: µ-Bondapak^R C₁₈, µ-Porasil^R, je 0,39 x 30 cm; Geräte: ALC/GPC 244 mit Solvent Programmer 660 und Integrationssystem 730.

Fließmittelkombinationen (Flußgeschwindigkeit 2 ml/min) und substanzspezifische Retentionsvolumina sind bei den jeweiligen Untersuchungen angegeben.

Schmelzpunkte wurden am Mikroskopheiztisch 350 (Leitz, Wetzlar) bestimmt. Mischschmelzpunkte wurden ermittelt, nachdem authentische und zu prüfende Substanzen im selben Verhältnis in geeignetem Lösungsmittel gelöst und anschließend auskristallisiert waren.

ERGEBNISSE

1. Reaktionen von 2-Hydroxyphenetidin und 4-Nitrosophenetol mit Hämoglobin

1.1. Ferrihämoglobinbildung durch 2-Hydroxyphenetidin und 4-Nitrosophenetol im Hund

2-Hydroxyphenetidin bildete nach i.v.-Injektion schnell Ferrihämoglobin. Die Zeit zum Erreichen halbmaximaler Ferrihämoglobinämie betrug bei allen untersuchten Dosen weniger als 2 min; maximale Werte waren nach 15 min erreicht.

4-Nitrosophenetol bildete nach i.v.-Injektion schneller Ferrihämoglobin, die Maxima wurden bereits nach 5 min erreicht. Um gleiche Ferrihämoglobinmengen zu bilden, wurde gegenüber 2-Hydroxyphenetidin nur etwa die Hälfte an 4-Nitrosophenetol benötigt (Abb. 1; bei den 4-Nitrosophenetolkurven sind zum Vergleich auch Ergebnisse von BAADER et al. (3) dargestellt).

1.2. Ferrihämoglobinbildung durch 2-Hydroxyphenetidin und 4-Nitrosophenetol in gewaschenen Hundeerythrozyten

FrISChe gewaschene Hundeerythrozyten (12 g Hb/100 ml in 0,2 M Phosphatpuffer, pH 7,4, mit 10 mM Glucosezusatz) wurden mit 0,2 und 1 mM 2-Hydroxyphenetidin inkubiert. Abb. 2 zeigt, daß die Ferrihämoglobinbildung biphasisch verläuft: nach initial schneller Bildung nimmt die weitere Ferrihämoglobinkonzentration nur noch langsam, jedoch stetig zu. Bei der fünffachen 2-Hydroxyphenetidin-konzentration wurde die Ausbeute an Ferrihämoglobin lediglich verdoppelt.

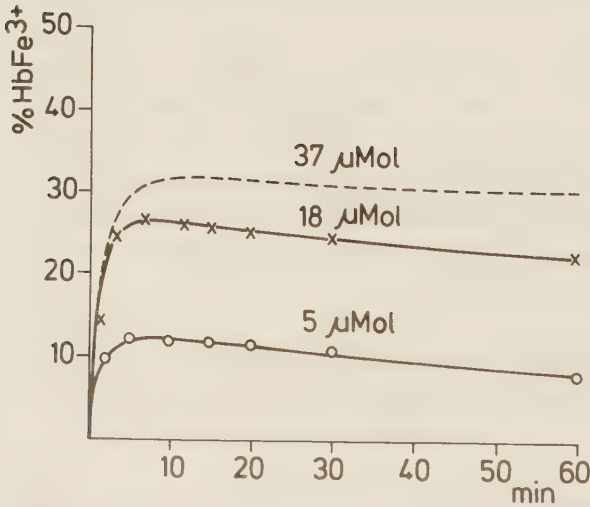
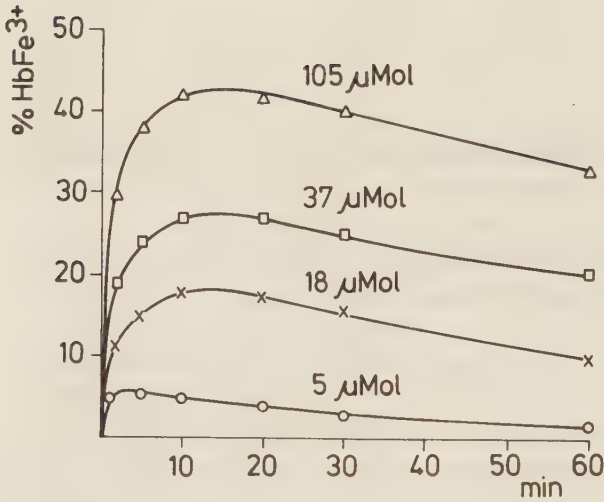


Abb. 1 Ferrihämoglobinbildung im Hund

2-Hydroxyphenetidin (A) bzw. 4-Nitrosophenetol (B) wurden Beagle-Hündinnen innerhalb von 15 s injiziert (angegeben in $\mu\text{Mol/kg}$ Körpergewicht).

Die durchbrochene Kurve zeigt Ergebnisse von BAADER et al. (3) für $37 \mu\text{Mol}$ 4-Nitrosophenetol/kg KG.

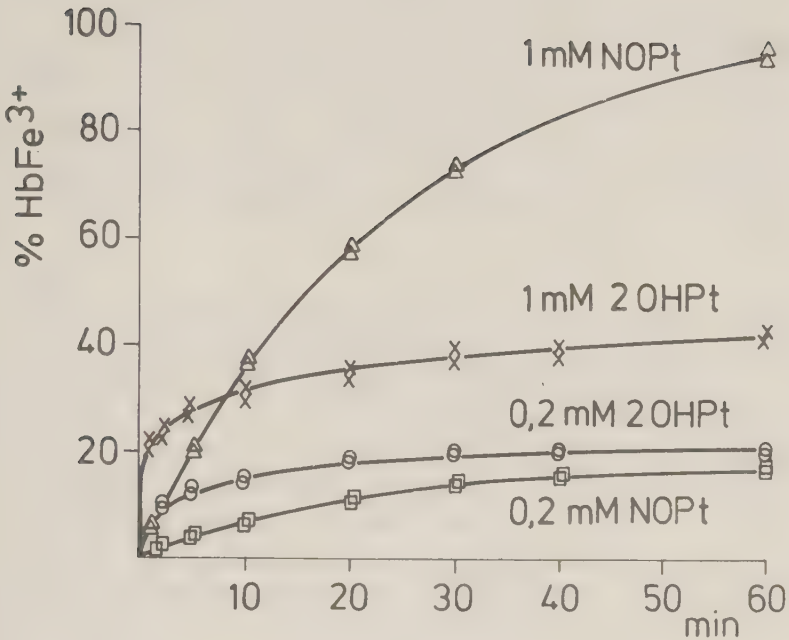


Abb. 2 Ferrihämoglobinbildung durch 2-Hydroxyphenetidin und 4-Nitrosophenetol in Erythrozytensuspensionen von Hunden

Gewaschene Hundeerythrozyten (12 g Hb/100 ml in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4, mit 10 mM Glucose) wurden mit 2-Hydroxyphenetidin (2OHPt) bzw. 4-Nitrosophenetol (NOPt) bei 37°C unter Luft inkubiert (jeweils 2 Experimente).

Im Gegensatz zu Ergebnissen in vivo bildete 4-Nitrosophenetol in Erythrozytensuspensionen initial deutlich langsamer Ferrihämoglobin als 2-Hydroxyphenetidin. Die Kinetik scheint monophasisch zu verlaufen. Wie ein Vergleich der Ferrihämoglobinbildung durch 0,2 mM mit der durch 1 mM 4-Nitrosophenetol zeigt, wurde entsprechend der fünffachen 4-Nitrosophenetol-Konzentration zu jedem Zeitpunkt die fünffache Menge an Ferrihämoglobin gebildet.

Diese ungewöhnlichen Dosis-Wirkungsbeziehungen wurden über einen weiteren Konzentrationsbereich verfolgt und sind in Abb. 3 dargestellt. Beide Dosis-Wirkungskurven zeigen Abweichungen von der üblichen hyperbolischen Funktion. Der sigmoide Verlauf der 4-Nitrosophenetol-Dosis-Wirkungskurve, der in der Arbeitsgruppe anderweitig untersucht worden war, wurde auf Reaktionen mit Glutathion zurückgeführt, die 4-Nitrosophenetol aus dem katalytischen Kreisprozeß der Ferrihämoglobinbildung entfernen (22). Dagegen ließ die biphasische Dosis-Wirkungskurve für 2-Hydroxyphenetidin an die Beteiligung mehrerer aktiver Verbindungen bei der Ferrihämoglobinbildung denken. Um anderweitige erythrozytäre Einflüsse auszuschließen, wurden weitere Untersuchungen mit gereinigtem Menschenhämoglobin durchgeführt.

1.3. Reaktionen von 2-Hydroxyphenetidin mit gereinigtem Menschenhämoglobin

Auch in Gegenwart gereinigten Menschenhämoglobins verlief die Ferrihämoglobinbildung durch 2-Hydroxyphenetidin biphasisch und war durch Erhöhung der Konzentration nur geringgradig zu steigern (Abb. 4).

Ätherextrakte dieser Ansätze enthielten einen gelben Farbstoff, der unter Violettfärbung in Salzsäure reextrahiert werden konnte. Das isolierte Material erwies sich anhand seiner spektroskopischen Daten (UV-, VIS-,

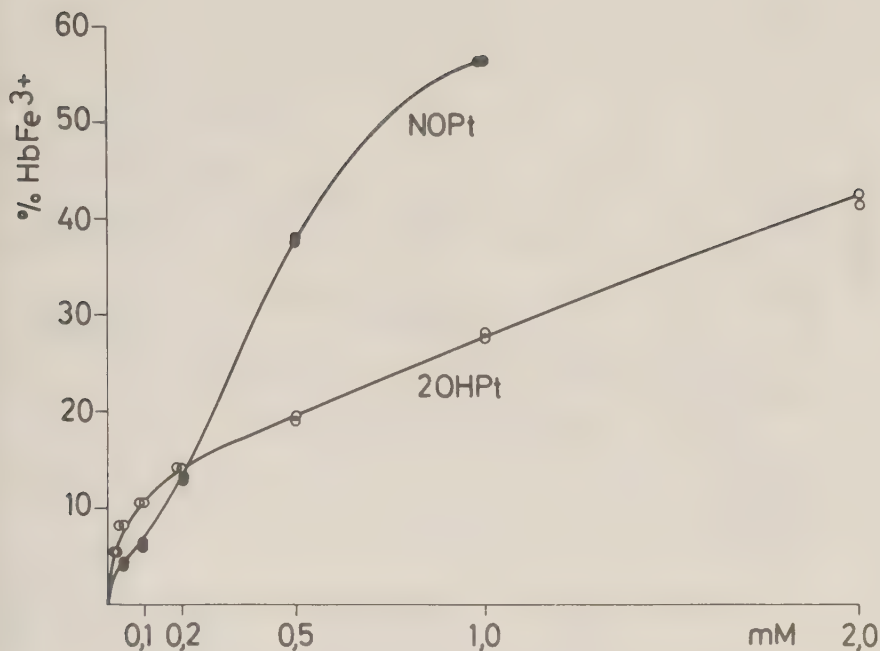


Abb. 3 Dosisabhängigkeit der Ferrihämoglobinbildung durch 2-Hydroxyphenetidin und 4-Nitrosophenetol

Gewaschene Hundeerythrozyten (12 g Hb/100 ml in 0,2 M Phosphatpuffer, pH 7,4, mit 10 mM Glucose) wurden mit verschiedenen Konzentrationen von 2-Hydroxyphenetidin (2OHPt) bzw. 4-Nitrosophenetol (NOPt) bei 37°C 30 min unter Luft inkubiert (jeweils 2 Experimente).

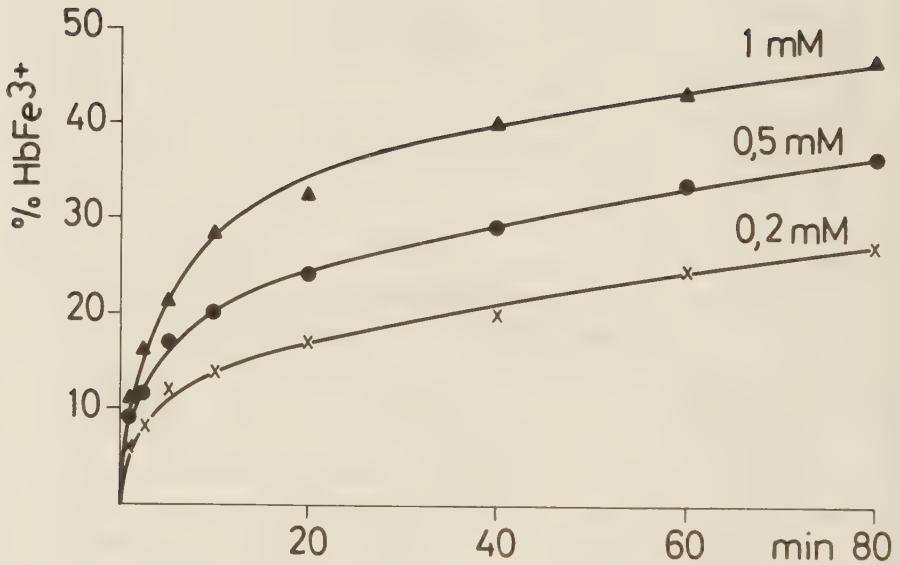


Abb. 4 Ferrihämoglobinbildung durch 2-Hydroxyphenetidin

Verschiedene Konzentrationen von 2-Hydroxyphenetidin wurden mit gereinigtem Menschenhämoglobin (3mM HbFe²⁺ in Phosphatpuffer, 0,2 M, pH 7,4) bei 37°C unter Luft inkubiert.

Die Ergebnisse wurden um die autoxidationsbedingte Ferrihämoglobinbildung korrigiert; die Marken sind Mittel aus jeweils drei Experimenten.

IR-, NMR- und Massenspektren) als 2-Amino-7-ethoxy-3H-phenoxazin-3on. Um zu prüfen, ob das Phenoxazon selbst auch Ferrihämoglobin bildet, wurde synthetisches 2-Amino-7-ethoxy-3H-phenoxazin-3on mit gereinigtem Menschenhämoglobin inkubiert.

1.4. Ferrihämoglobinbildung durch 2-Amino-7-ethoxy-3H-phenoxazin-3on

In gereinigter Menschenhämoglobinlösung (3 mM) bildete 0,2 mM 2-Amino-7-ethoxy-3H-phenoxazin-3on langsamer und weniger Ferrihämoglobin als eine äquivalente Menge von 2-Hydroxyphenetidin (Abb. 5). Immerhin wurden nach einer Stunde ca. 15% Ferrihämoglobin gefunden. Somit bildete das Phenoxazon auch mehrere Äquivalente Ferrihämoglobin und konnte an der biphasischen Kinetik der Ferrihämoglobinbildung durch 2-Hydroxyphenetidin beteiligt sein.

1.5. Einfluß der Hämoglobinkonzentration auf die Geschwindigkeit der 2-Hydroxyphenetidin-Abnahme

Oxyhämoglobin beschleunigte die Abnahmegeschwindigkeit von 2-Hydroxyphenetidin deutlich: bei 1 mM 2-Hydroxyphenetidin wurde sie bereits in Gegenwart von 0,012 mM Oxyhämoglobin gegenüber der reinen Autoxidation verdoppelt (Abb. 6). Bei 3 mM Hämoglobinkonzentration betrug die Halbwertszeit von 2-Hydroxyphenetidin nur noch etwa 1 min. Somit schien der schnelle 2-Hydroxyphenetidin-Abfall mit der kurzfristigen schnellen Phase der Ferrihämoglobinbildung zu korrelieren, während die langsame, weitere Ferrihämoglobinzunahme durch das Kondensationsprodukt verursacht sein konnte.

Die Bildung von Phenoxazonen aus ortho-Aminophenolen wird allgemein als Kondensationsreaktion von zwei oxidierten Molekülen, den ortho-Chinoniminen, angesehen

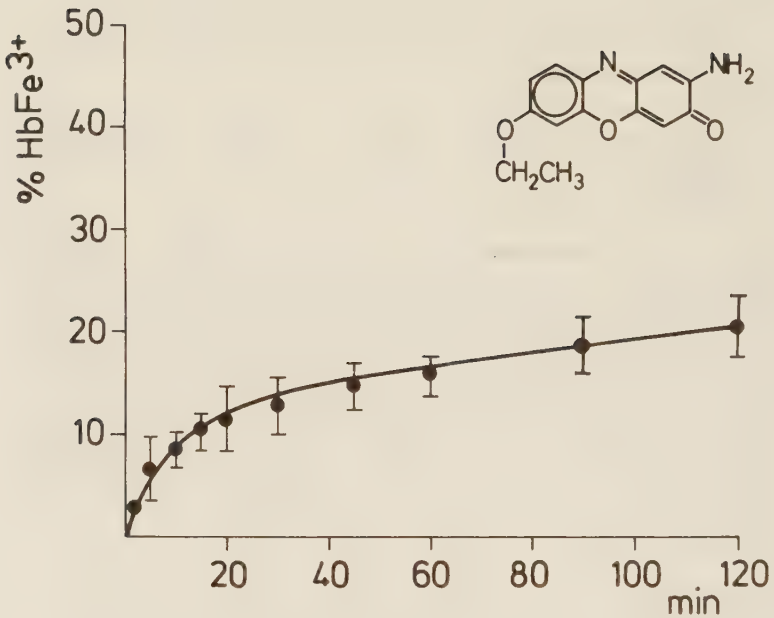


Abb. 5 Ferrihämoglobinbildung durch 2-Amino-7-ethoxy-3H-phenoxazin-3on

2-Amino-7-ethoxy-3H-phenoxazin-3on (0,2 mM) wurde mit gereinigtem Menschenhämoglobin (3 mM HbFe²⁺ in 0,2 M Phosphatpuffer, pH 7,4) bei 37°C unter Luft inkubiert.

Die Ergebnisse wurden um die autoxidationsbedingte Ferrihämoglobinbildung korrigiert; die Marken sind Mittel aus jeweils fünf Experimenten $\pm$ SEM (95% Vertrauensintervall).

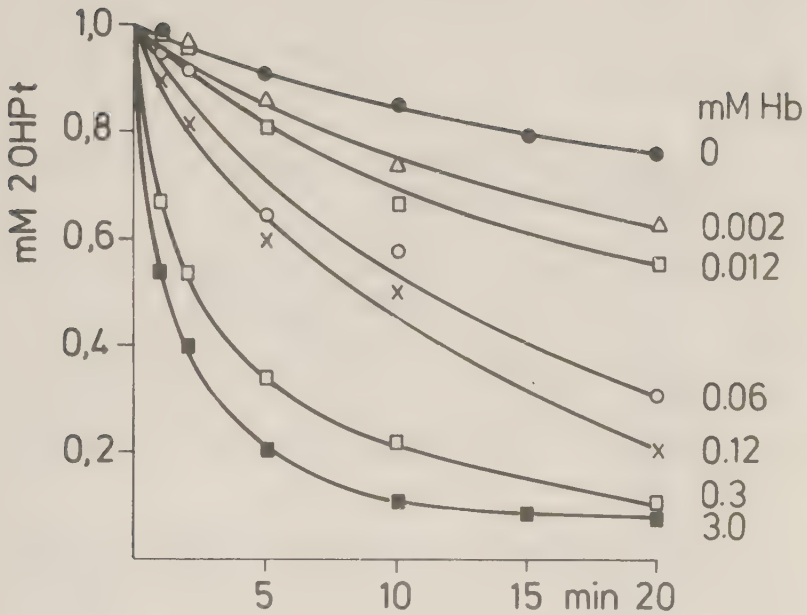


Abb. 6 Einfluß der Hämoglobinkonzentration auf die Abnahme von 2-Hydroxyphenetidin

1,0 mM 2-Hydroxyphenetidin (20HPT) wurde mit verschiedenen Konzentrationen gereinigten Menschenhämoglobins in Phosphatpuffer (0,2 M, pH 7,4) bei 37°C unter Luft inkubiert.

(73, 72). Diese reaktiven, äußerst instabilen Verbindungen bilden leicht Addukte mit Nukleophilen wie Thio-
len und Aminen. Insofern wurden sowohl kovalente Bin-
dung an Hämoglobin wie auch Thioätherbildung mit Gluta-
thion erwartet.

1.6. Bindung von (^{14}C)2-Hydroxyphenetidin an gereinig- tes Menschenhämoglobin

^{14}C -markiertes 2-Hydroxyphenetidin (0,2 mM) wurde mit
gereinigtem Menschenhämoglobin (3 mM) 30 min inkubiert.
Danach wurde der Ansatz eiskühlt und mit 1 N Salzsäu-
re auf pH 1,9 gebracht. Nach erschöpfender Extraktion
mit Methyläthylketon nach TEALE (91) wurden 67% der Ak-
tivität in der das Hämin enthaltenden, organischen Pha-
se gefunden.

Die Globinphase wurde an Sephadex^R G 75 fine (2,5x40cm)
mit 10 mM Essigsäure chromatographiert. Die Radioakti-
vität befand sich hier in den proteinhaltigen Fraktio-
nen. Da die Radioaktivität im Präzipitat (nach Fällung
mit 0,6 M Trichloressigsäure) gefunden wurde, konnte
eine kovalente Bindung von 2-Hydroxyphenetidin-Metabo-
liten an Hämoglobin angenommen werden.

1.7. Reaktionen von oxidiertem 2-Hydroxyphenetidin mit Thiolen in Inkubaten mit Menschenhämoglobin

Wurde gereinigte Menschenhämoglobininlösung (3 mM) bei pH
7,4 mit 2-Hydroxyphenetidin (1 mM) 60 min inkubiert, so
ergab die anschließende Titration der SH-Gruppen des
Hämoglobins eine Verminderung um 0,28 mM. Glutathion-
zusatz verhinderte die Reaktion mit HbSH-Gruppen, wobei
es selbst vermindert wurde.

Dagegen war eine Reaktion mit den basischen Aminosäuren
Histidin und Lysin (im Vergleich zu Kontrollansätzen,
Tab. 8) nicht sicher nachweisbar (Tab. 5).

TABELLE 5

Reaktionen von 2-Hydroxyphenetidin mit zugesetztem Glutathion, Lysin und Histidin in Lösungen gereinigten Hämoglobins

eingesetzt			gefunden 60 min		fehlend 60 min		gefunden 120 min		fehlend 120 min	
GSH (mM)	LYS (mM)	HIS (mM)	GSH (mM)	LYS (mM)	GSH (mM)	LYS (mM)	GSH (mM)	LYS (mM)	GSH (mM)	HIS (mM)
4,75	5,0	5,0	3,45	4,87	1,30	0,13	3,21	4,68	1,54	0,32
4,75	1,0		3,60		1,15		3,09	0,96	1,66	0,04
0,95	5,0		0,31	4,98	0,64	0,02	0,45	4,87	0,50	0,13
0,95	1,0		0,39		0,56		0,44	0,97	0,51	0,03

2-Hydroxyphenetidin (2 mM) wurde mit reduziertem Glutathion (GSH), Lysin (LYS) und Histidin (HIS) sowie gereinigtem Menschenhämoglobin (3 mM HbFe²⁺ in 0,2 M Phosphatpuffer, pH 7,4) bei 37°C unter Luft 60 bzw. 120 min inkubiert. Konzentrationsangaben für GSH-gefunden / GSH-fehlend bedeuten Gesamt-Glutathion (GSH + 2 GSSG).

Die Ferrihämoglobinbildung durch 2-Hydroxyphenetidin wurde durch anwesendes Glutathion nicht vermindert, sondern sogar leicht erhöht: Abb. 7 (vgl. auch Abb. 4).

Alle diese Befunde wiesen darauf hin, daß die Reaktivität des oxidierten 2-Hydroxyphenetidins mit Thiolen erheblich geringer als die des in der Arbeitsgruppe ausführlich untersuchten oxidierten 4-Dimethylaminophenols war. Deshalb sollten in einem systematischen Vergleich Reaktionen von ortho- und para-Aminophenolen untersucht werden.

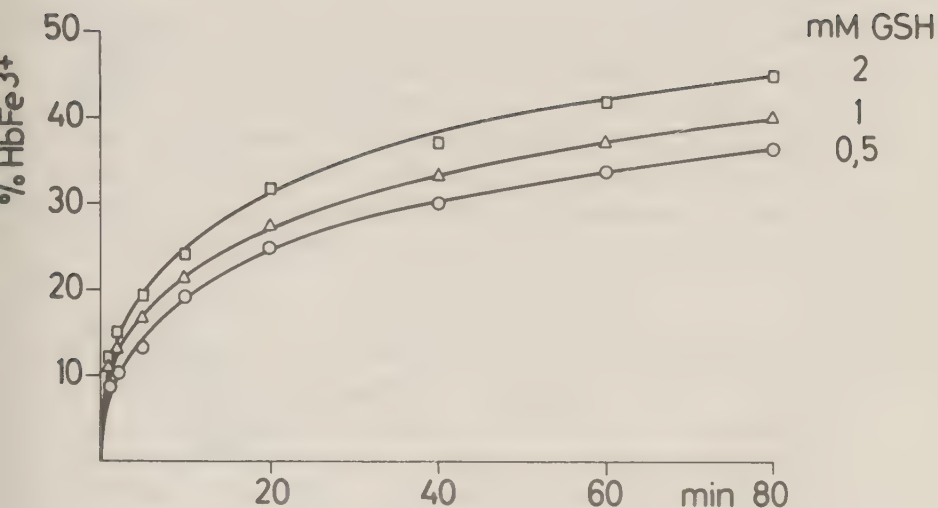


Abb. 7 Einfluß von Glutathion auf die Ferrihämoglobinbildung durch 2-Hydroxyphenetidin

0,5 mM 2-Hydroxyphenetidin wurde mit verschiedenen Konzentrationen reduzierten Glutathions (GSH) in Lösungen gereinigten Menschenhämoglobins (3 mM HbFe²⁺ in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4) bei 37°C unter Luft inkubiert.

Die Ergebnisse wurden um die autoxidationsbedingte Ferrihämoglobinbildung korrigiert.

2. Reaktionen von 2- und 4-Aminophenol mit Hämoglobin vom Menschen

2.1. Ferrihämoglobinbildung durch 2- und 4-Aminophenol

2-Aminophenol bildete deutlich schneller Ferrihämoglobin als 4-Aminophenol: Abb. 8 zeigt, daß die Anfangsgeschwindigkeit der Ferrihämoglobinbildung durch 0,5 mM 2-Aminophenol in gereinigter Menschenhämoglobinlösung (3 mM) etwa dreimal höher als durch 4-Aminophenol (bei gleichen Bedingungen) war, während die maximale Ausbeute an Ferrihämoglobin bei beiden Aminophenolen ähnlich war.

Der Unterschied in der Geschwindigkeit der Ferrihämoglobinbildung wurde noch deutlicher, wenn diese Aminophenole in einer Suspension gewaschener Erythrozyten vom Menschen (5 g Hb/100 ml) inkubiert wurden. Hier lag die Anfangsgeschwindigkeit der Ferrihämoglobinbildung durch 2-Aminophenol ca. 15 mal höher als durch 4-Aminophenol (Abb. 8). Auch fiel auf, daß die Ferrihämoglobinbildung in Erythrozyten durch 2-Aminophenol schneller, durch 4-Aminophenol dagegen langsamer erfolgte als in Lösungen gereinigten Hämoglobins. Deshalb wurde zunächst das Schicksal dieser Aminophenole nach ihrer Oxidation untersucht.

2.2. Schicksal der Aminophenole nach ihrer Autoxidation

Wurden 2- oder 4-Aminophenol in Phosphatpuffer (0,2 M, pH 7,4) inkubiert, so verhielten sich beide Isomere unterschiedlich: die Lösung mit 2-Aminophenol verfärbte sich von gelb nach ocker und nahm innerhalb von Stunden tiefgoldbraune Farbe an. Dieser Farbstoff ließ sich mit Äther extrahieren und zeigte im sichtbaren Spektralbereich typische Phenoxazon-Absorptionsbanden. Durch 1 N Salzsäure konnte das Produkt unter schwachroter Verfärbung reextrahiert werden. Nach Umkristallisation (vgl.

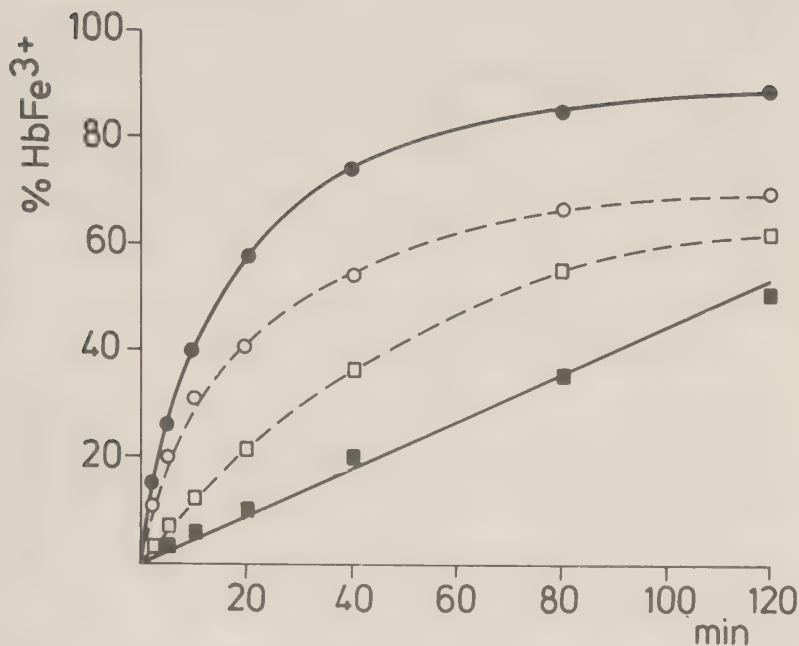


Abb. 8 Ferrihämoglobinbildung durch 2- bzw. 4-Aminophenol in Hämoglobin und Erythrozytensuspensionen

2-Aminophenol (○) bzw. 4-Aminophenol (□), jeweils 0,5 mM, wurden mit gereinigtem Menschenhämoglobin (3 mM HbFe²⁺) in 0,2 M Phosphatpuffer, pH 7,4, bei 37°C unter Luft inkubiert (durchbrochene Kurven).

2-Aminophenol (●) bzw. 4-Aminophenol (■), jeweils 0,5 mM, wurden mit gewaschenen Menschenerthrozyten, 5 g Hb/100 ml, in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4 suspendiert und bei 37°C unter Luft inkubiert (durchgezogene Kurven).

Die Ergebnisse wurden um die autooxidationsbedingte Ferrihämoglobinbildung korrigiert.

Material) erwies sich das isolierte Produkt anhand seiner spektroskopischen Daten (UV-, VIS-, IR-, NMR- und Massenspektrum) sowie des Schmelzpunktes als identisch mit 2-Amino-3H-phenoxazin-3on (73, 72, 84, 70, 4, 77, 85).

Die Lösung mit 4-Aminophenol verfärbte sich langsam über violett nach rotbraun. Ätherextrakte blieben dagegen weitgehend farblos und wiesen im wesentlichen nur 4-Aminophenol in abnehmender Konzentration auf.

2.3. Einfluß der Hämoglobinkonzentration auf die Geschwindigkeit der Aminophenolabnahme

Oxyhämoglobin beschleunigte die Geschwindigkeit der Abnahme beider Aminophenol-Isomere unterschiedlich. Die Abbildungen 9 und 10 zeigen Ergebnisse nach Inkubation von jeweils 0,5 mM 2-/4-Aminophenol in Phosphatpuffer allein sowie in Gegenwart von 0,06 mM, 0,6 mM und 3 mM gereinigten Hämoglobins. Dabei nahm die Konzentration von 2-Aminophenol in Puffer langsamer als von 4-Aminophenol ab, die Beschleunigung dieses Abbaus durch Oxyhämoglobin war bei 2-Aminophenol jedoch ausgeprägter: 2/3 des 2-Aminophenols waren nach 20 min bei 3 mM Oxyhämoglobin abgebaut, aber nur 1/5 des 4-Aminophenols.

Unabhängig von der Hämoglobinkonzentration wurden bei der 2-Aminophenol-Oxidation im wesentlichen äquivalente Mengen von 2-Amino-3H-phenoxazin-3on als einziges Reaktionsprodukt gebildet. Offensichtlich war dieses Kondensationsprodukt stabil; auch bei direkter Inkubation (0,2 mM) mit gereinigtem Menschenhämoglobin (3 mM) nahm die Phenoxazonkonzentration in 3 Stunden nicht wesentlich ab; allerdings entstanden geringe Mengen Ferrihämoglobin (Abb. 11).

In den Ätherextrakten von 4-Aminophenol-Inkubaten mit Hämoglobin wurden dagegen keine Metabolite gefunden (UV VIS, HPLC). Es lag somit nahe, analog zu Reaktionen von

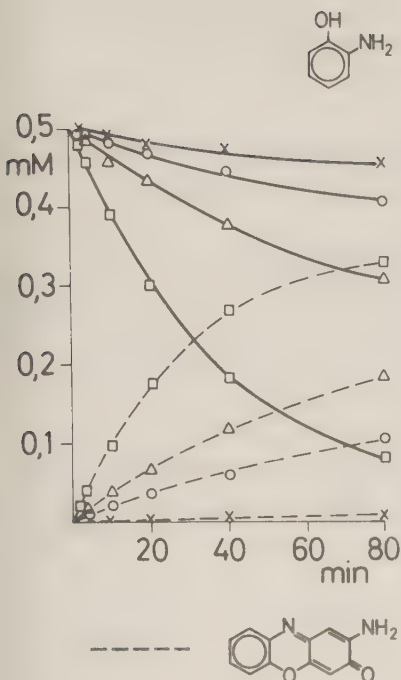


Abb. 9

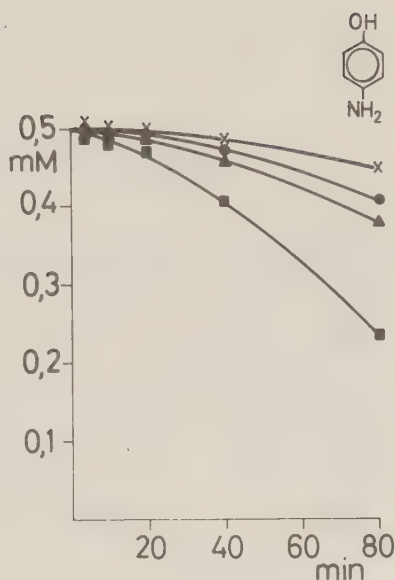


Abb. 10

Einfluß der Hämoglobinkonzentration auf die Abnahmegeschwindigkeit von 2- bzw. 4-Aminophenol

Abb. 9 2-Aminophenol (0,5 mM) wurde in Phosphatpuffer allein (x; 0,2 M, pH 7,4) sowie mit gereinigtem Hämoglobin vom Menschen in verschiedenen Konzentrationen bei 37°C unter Luft inkubiert: 0,06 mM (○), 0,6 mM (▲), 3 mM (□) HbFe^{2+} in Phosphatpuffer. Durchbrochene Kurven: Konzentrationen von gebildetem 2-Amino-3H-phenoxazin-3on (Äquivalente)

Abb. 10 4-Aminophenol (0,5 mM) wurde unter gleichen Bedingungen wie in Abb.9 untersucht: 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4 (x); Hämoglobin mit 0,06 mM (●), 0,6 mM (▲), 3,0 mM (■) HbFe^{2+} .

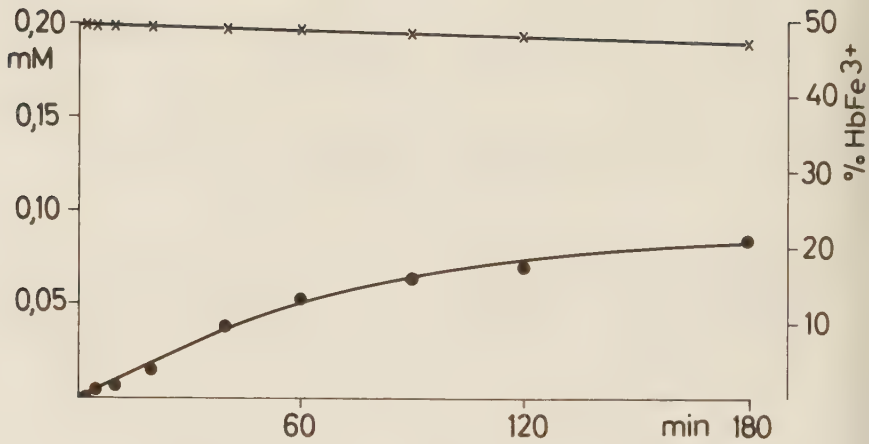


Abb. 11 Abnahme von 2-Amino-3H-phenoxazin-3on und Ferrihämoglobinbildung

0,2 mM 2-Amino-3H-phenoxazin-3on wurden mit gereinigtem Menschenhämoglobin (3 mM HbFe²⁺) in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4 bei 37°C unter Luft inkubiert.

- x 2-Amino-3H-phenoxazin-3on (mM)
- Ferrihämoglobin (% , Autoxidation abgezogen)

4-Dimethylaminophenol (31), kovalente Bindung von Oxi-
dationsprodukten des 4-Aminophenols an Hämoglobin anzu-
nehmen.

2.4. Reaktionen der Aminophenole mit Hämoglobin-SH- Gruppen

2- bzw. 4-Aminophenol (jeweils 1,9 mM) wurden in gerei-
nigter Hämoglobinlösung 60 min inkubiert. Nach Dialyse
des Inkubats wurden die reaktionsfähigen Hämoglobin-SH-
Gruppen bestimmt. Tab. 6 zeigt, daß 2-Aminophenol nur
7% der vorhandenen HbSH-Gruppen blockierte (dagegen 60%
bei 4-Aminophenol). Aus 2-Aminophenol waren hier 0,83mM
2-Amino-3H-phenoxazin-3on gebildet worden, entsprechend
87% der theoretischen Menge.

TABELLE 6

Blockade der Hämoglobin-SH-Gruppen durch Aminophenole

Inkubat	HbSH (mM)	
	gefunden	blockiert
Hämoglobin (Kontr.)	1,53	0
Hb + 2-Aminophenol	1,42	0,11
Hb + 4-Aminophenol	0,63	0,90

2- bzw. 4-Aminophenol (je 1,9 mM) wurden mit gereinig-
tem Menschenhämoglobin, 3 mM HbFe^{2+} in 0,2 M Phosphat-
puffer, pH 7,4, 60 min bei 37 °C unter Luft inkubiert.

2.5. Einfluß von zugesetzten Thiolen und Aminosäuren auf Reaktionen der Aminophenole mit Hämoglobin

Aufgrund der Affinität des oxidierten 4-Aminophenols zu den SH-Gruppen des Hämoglobins wurde untersucht, ob zugesetztes Glutathion und gegebenenfalls basische Aminosäuren mit Bindungsstellen des Hämoglobins um 2- bzw. 4-Aminophenol konkurrieren und Addukte bilden können. Einzeln wie auch kombiniert wurden daher reduziertes Glutathion, Lysin und Histidin mit 2- bzw. 4-Aminophenol (jeweils 2 mM) mit gereinigtem Hämoglobin vom Menschen (3 mM) 60 min inkubiert.

In den Versuchen mit Einzelkomponenten (Glutathion, Lysin oder Histidin) ließen sich Reaktionen nur mit Glutathion sicher nachweisen (Tab. 7). In diesen Glutathion enthaltenden Inkubaten wurde keine Blockade von Hämoglobin-SH-Gruppen gefunden. Lysin und Histidin dagegen vermochten eine Blockade der HbSH-Gruppen durch die Aminophenole nicht zu verhindern; weder Lysin noch Histidin nahmen dabei in ihrer Konzentration wesentlich ab.

Tab. 8 zeigt Versuchsergebnisse mit Thiol-Aminosäure-Kombinationen verschiedener Konzentrationen mit 2- bzw. 4-Aminophenol (jeweils 2 mM) in gereinigter Hämoglobininlösung (3 mM) nach 60 bzw. 120 min Inkubation. Deutlich war auch hier nur die Glutathionkonzentration verringert, unabhängig von gleichzeitig anwesenden basischen Aminosäuren, welche nicht signifikant abnahmen. Reaktionsfähige HbSH-Gruppen waren nur in 4-Aminophenol-Inkubaten vermindert: nach weitgehender Verarmung an Glutathion (85% bei 1 mM; 60% bei 5 mM) waren 57% bzw. 27% der SH-Gruppen blockiert.

Nach allen Befunden schienen - zu diesem Zeitpunkt der Untersuchung - 2-Aminophenole wesentlich leichter (nach

TABELLE 7

Reaktionen von 2- und 4-Aminophenol mit zugesetztem Glutathion, Lysin bzw. Histidin in Lösungen gereinigten Hämoglobins

INKUBAT	+ GLUTATHION		+ LYSIN		+ HISTIDIN							
	gefunden	fehlend	gefunden	fehlend	gefunden	fehlend						
	GSH (mM)	HbSH (mM)	GSH (mM)	HbSH (mM)	LYS (mM)	HbSH (mM)	HIS (mM ⁴)	HbSH (mM)				
alb	4,4	1,5	0	0	3,4	1,5	0	0	4,7	1,5	0	0
Hb + 2-AP	3,51	1,5	0,89	0	3,3	1,41	0,1	0,09	4,7	1,4	0	0,1
Hb + 4-AP	1,72	1,46	2,68	0,04	3,2	0,59	0,2	0,91	4,68	0,56	0,02	0,94

2- und 4-Aminophenol (2-AP, 4-AP, jeweils 2 mM) wurden mit reduziertem Glutathion bzw. Lysin (LYS) oder Histidin (HIS) und gereinigtem Menschenhämoglobin (Hb; 3 mM HbFe²⁺ in 0,2 M Phosphatpuffer, pH 7,4) 60 min bei 37°C unter Luft inkubiert. Konzentrationsangaben für GSH-gefunden und GSH-fehlend bedeuten Gesamt-Glutathion (GSH + 2GSSG).

TABELLE 8

Reaktionen von 2- und 4-Aminophenol mit zugesetztem Glutathion, Lysin und Histidin in Lösungen gereinigten Hämoglobins

INKUBAT	zugesetzt			gefunden 60 min			fehlend 60 min			gefunden 120 min			fehlend 120 min		
	GSH (mM)	LYS (mM)	HIS (mM)	GSH (mM)	LYS (mM)	HIS (mM)	GSH (mM)	LYS (mM)	HIS (mM)	GSH (mM)	LYS (mM)	HIS (mM)	GSH (mM)	LYS (mM)	HIS (mM)
Hämoglobin (Kontrolle)	4,75	5,0	5,0	4,67	4,92	0,08	0,08	0,08		4,12	5,0	4,51	0,63	0	0,49
	4,75	1,0		4,85	0,98	-0,1	0,02	0,02		4,07	0,99		0,68	0,01	0
	0,95	5,0		0,93	5,08	0,02	-0,08			0,66	5,16		0,29	-0,16	0
	0,95	1,0		0,88	0,94	0,17	0,06			0,80	0,98		0,15	0,02	0
Hämoglobin + 2-AP	4,75	5,0	5,0	3,69	4,64	1,06	0,36			3,24	4,74	4,71	1,51	0,26	0,29
	4,75	1,0		4,11	0,91	0,64	0,09			3,39	0,99		1,36	0,01	0
	0,95	5,0		0,54	4,78	0,56	0,22			0,55	5,02		0,40	-0,02	0
	0,95	1,0		0,47	0,92	0,48	0,08			0,64	1,01		0,31	-0,01	0
Hämoglobin + 4-AP	4,75	5,0	5,0	2,05	4,88	2,7	0,12			1,26	5,06	4,68	3,49	-0,06	0,32
	4,75	1,0		1,92		2,83				1,22	0,93		3,53	0,07	0,41
	0,95	5,0		0,14	4,9	0,81	0,1			0,23	4,8		0,72	0,2	0,86
	0,95	1,0		0,13		0,82				0,21	0,96		0,74	0,04	0,86

2- und 4-Aminophenol (2-AP, 4-AP, jeweils 2 mM) wurden in Gegenwart von reduziertem Glutathion (GSH), Lysin (LYS) und Histidin (HIS) mit gereinigtem Menschenhämoglobin (3 mM HbFe^{2+}) in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4 bei 37°C unter Luft inkubiert. Glutathion wurde als Gesamt-Glutathion bestimmt.

ihrer Oxidation) zu Phenoxazonen zu kondensieren als Additionsreaktionen einzugehen. Da jedoch der Farbstoff 2-Amino-3H-phenoxazin-3on zwei oxidierte Moleküle des 2-Aminophenols zur Kondensation benötigte, war es denkbar, daß bei niedriger Konzentration von 2-Aminophenol die Kondensation zurückgedrängt wird und so eher Additionsreaktionen stattfinden. Deshalb wurden weitere Untersuchungen bei sehr niedrigen Konzentrationen mit radioaktivem 2-Aminophenol durchgeführt.

2.6. Kinetik der Abnahme von (^{14}C)2-Aminophenol und der kovalenten Bindung an Hämoglobin sowie der Bildung von (^{14}C)2-Amino-3H-phenoxazin-3on

Um die Geschwindigkeit der Abnahme von 2-Aminophenol, seiner kovalenten Bindung an Hämoglobin sowie der Kondensation zum Phenoxazon zu untersuchen, wurde ^{14}C -markiertes 2-Aminophenol (5 μM) mit gereinigtem Hämoglobin (3 mM) inkubiert. Abb. 12 zeigt die proportional zur 2-Aminophenol-Abnahme zunehmende kovalente Bindung von (^{14}C)2-Aminophenol an das Hämoglobin.

Die Bildung von (^{14}C)2-Amino-3H-phenoxazin-3on verlief bei dieser Konzentration mit extrem geringer Geschwindigkeit; nach 160 min wurden zwischen 4,0 und 4,9% des 2-Aminophenols zum Phenoxazon kondensiert.

Im Überstand war (nach erschöpfender Ätherextraktion und Fällung mit 0,6 M Trichloressigsäure) keine Aktivität nachweisbar.

In Abwesenheit von Hämoglobin wurden dagegen 67% der Aktivität in 2-Amino-3H-phenoxazin-3on wiedergefunden, wenn (^{14}C)2-Aminophenol (3,2 μM) in 0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,4) 20 Stunden inkubiert wurde.

Außerdem wurden neben 2,3% unverändertem 2-Aminophenol 20% wasserlösliche Metabolite gefunden: diese wurden nicht weiter untersucht.

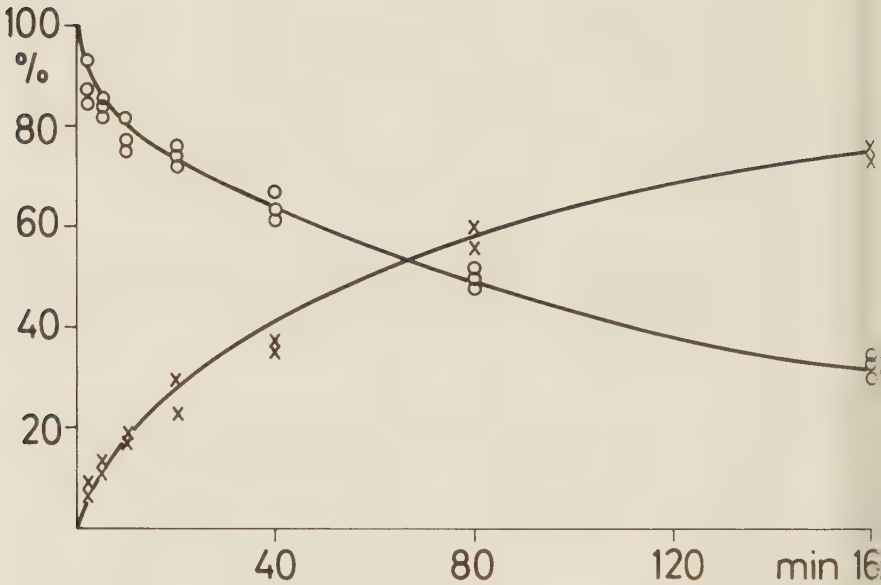


Abb. 12 Geschwindigkeit der 2-Aminophenol-Abnahme und der kovalenten Bindung an Hämoglobin

^{14}C -markiertes 2-Aminophenol ($5\text{ }\mu\text{M}$) wurde mit gereinigtem Menschenhämoglobin (3 mM HbFe^{2+}) in $0,2\text{ M}$ Phosphatpuffer pH $7,4$ bei 37°C unter Luft inkubiert.

- o (^{14}C) 2-Aminophenol
- x präzipitatgebundene Radioaktivität

2.7. Konzentrationsabhängigkeit der 2-Amino-3H-phenoxazin-3on-Bildung sowie der kovalenten Bindung von (^{14}C)2-Aminophenol an Hämoglobin

Wurde (^{14}C)2-Aminophenol (2 mM) über 24 Stunden mit gereinigter Hämoglobinlösung (3 mM) inkubiert, wurden nur 0,7% unverändertes (^{14}C)2-Aminophenol nach dieser Zeit gefunden. 92,4% der Aktivität von 2-Aminophenol fanden sich in 2-Amino-3H-phenoxazin-3on. Im Überstand waren, nach erschöpfender Ätherextraktion und Fällung mit 0,6M Trichloressigsäure, 0,4% der eingesetzten Substanzaktivität nachweisbar; 3,3% waren an das Präzipitat gebunden.

Im weiteren wurde die Abhängigkeit des Metabolitenmusters von der 2-Aminophenol-Konzentration in einem Bereich von 1 - 200 μM untersucht:

(^{14}C)2-Aminophenol wurde mit gereinigtem Menschenhämoglobin (3 mM) inkubiert; die Anteile von nicht umgesetztem (^{14}C)2-Aminophenol, gebildetem (^{14}C)2-Amino-3H-phenoxazin-3on, der säurelöslichen Metabolite sowie die hämoglobingebundene Aktivität wurden bestimmt. Abb. 13 zeigt die Abhängigkeit der Phenoxazonbildung von der Konzentration des 2-Aminophenols im Inkubat sowie die Bindung der Aktivität an Hämoglobin: die Phenoxazonbildung nahm proportional zur Konzentration von 2-Aminophenol zu, die kovalente Bindung an Hämoglobin entsprechend ab. 2-Aminophenol war jeweils zu über 96% umgesetzt.

2.8. Chromatographie des Hämoglobins nach Reaktion mit (^{14}C)2-Aminophenol

Nach der Annahme, daß die präzipitatgebundene Aktivität dem Anteil des kovalent an Hämoglobin gebundenen Aminophenols entspricht, mußten im Hinblick auf die Dosis-

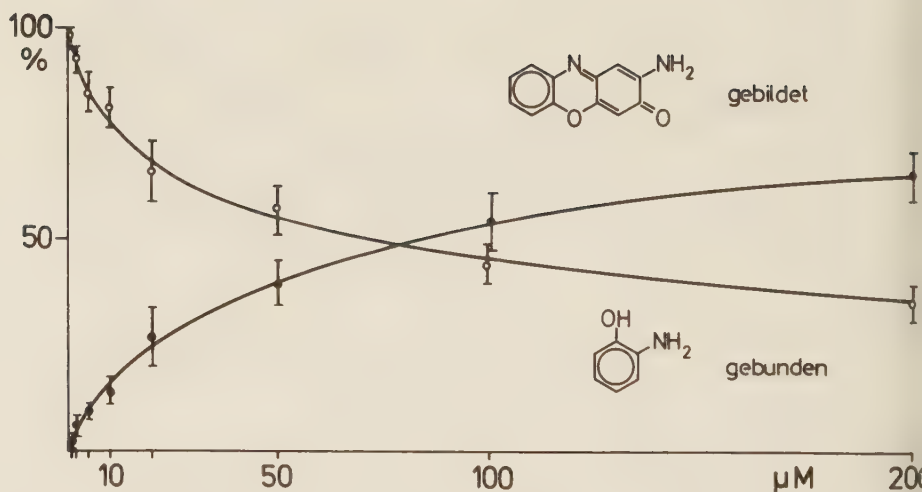


Abb. 13 Einfluß der Konzentration von 2-Aminophenol auf das Ausmaß der kovalenten Bindung an Hämoglobin und der Bildung von 2-Amino-3H-phenoxazin-3on

(^{14}C)2-Aminophenol (1 - 200 μM) wurde mit gereinigtem Menschenhämoglobin (3 mM HbFe^{2+} in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4) 24 h bei 37°C unter Luft inkubiert.

- Anteil der präzipitatgebundenen Radioaktivität von (^{14}C)2-Aminophenol
- Anteil an gebildetem (^{14}C)2-Amino-3H-phenoxazin-3on

Die Marken sind Mittel aus 5 Versuchen $\pm$ SEM (95% Vertrauensintervall).

Wirkungsbeziehung bei einer 2-Aminophenol-Konzentration von 5 μM etwa 85% der Substanz an Hämoglobin gebunden sein.

Das Inkubat - (^{14}C)2-Aminophenol (5 μM) in gereinigter Hämoglobinlösung (3 mM, 20 h) - wurde unbehandelt, lediglich filtriert, bei 4°C an Sephadex^R G 75 fine (2,5 x 40 cm) mit Phosphatpuffer (2 mM, pH 7,4) chromatographiert. In den eluierten Fraktionen wurden Hämoglobingehalt und Radioaktivität bestimmt. Das Chromatogramm (Abb. 14) zeigt, daß erwartungsgemäß 88% der Gesamtkativität von (^{14}C)2-Aminophenol zusammen mit Hämoglobin eluiert wurden; beide Gipfel befanden sich in derselben Fraktion.

2.9. Einfluß von zugesetztem Glutathion auf Reaktionen der Aminophenole mit Hämoglobin

Die Bindung der Aminophenole an Hämoglobin war durch Zugabe reduzierten Glutathions stark vermindert (2.5.). Es war daher zu prüfen, ob Glutathion auch weitere Reaktionen der Aminophenole beeinflusste.

Abb. 15 zeigt die in Menge und Geschwindigkeit identische Ferrihämoglobinbildung durch 0,5 mM 2-Aminophenol in Inkubaten mit gereinigtem Hämoglobin (3 mM) nach Zugabe von 2 mM reduziertem Glutathion im Vergleich zur Kontrolle ohne Zusatz. Hingegen bildete 4-Aminophenol in Gegenwart reduzierten Glutathions nur 2/3 der Ferrihämoglobinmenge des Kontrollinkubats.

Bei sehr niedrigen Konzentrationen fand sich ein deutlicher Einfluß des Glutathions auch bei 2-Aminophenol: wurden 5 μM ^{14}C -markiertes 2-Aminophenol mit gereinigtem Hämoglobin (3 mM) inkubiert, wurde die Halbwertszeit von 80 min (vgl. Abb.12) auf 10 min (Abb. 16) verringert. Nach 180 min war (^{14}C)2-Aminophenol kaum mehr nachweisbar.

(^{14}C)2-Amino-3H-phenoxazin-3on wurde auch hier nur sehr

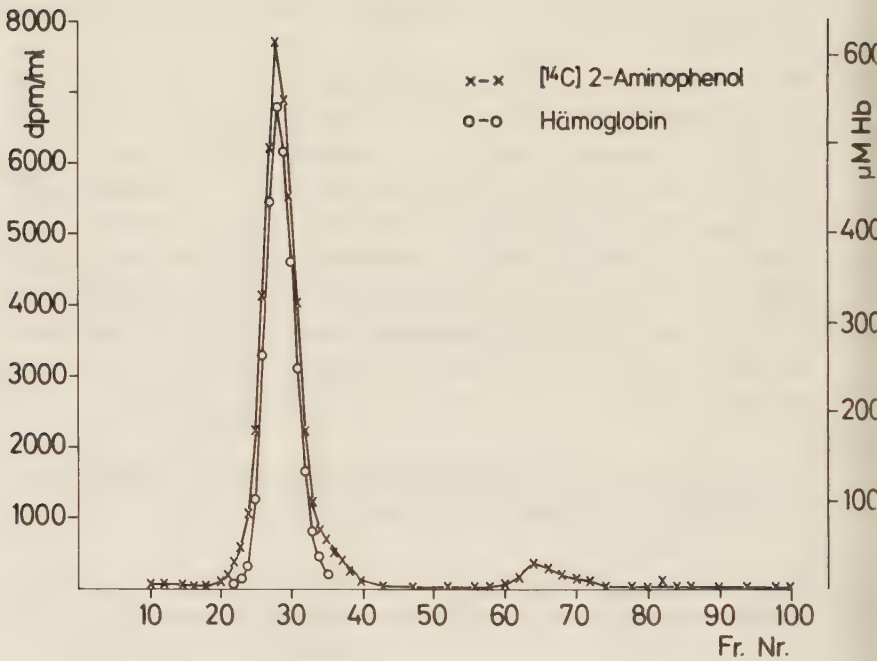


Abb. 14 Elutionsprofil von Hämoglobin und Radioaktivität nach Reaktion von (^{14}C)2-Aminophenol mit Hämoglobin

(^{14}C)2-Aminophenol ($5 \mu\text{M}$) wurde mit gereinigtem Menschenhämoglobin (3 mM HbFe^{2+} in Phosphatpuffer, $0,2 \text{ M}$, $\text{pH } 7,4$) 20 h bei 37°C unter Luft inkubiert und mit 2 mM Phosphatpuffer $\text{pH } 7,4$ an Sephadex^R G 75 fine ($2,5 \times 40 \text{ cm}$) bei 4°C chromatographiert.

- x Radioaktivität
- o Hämoglobinkonzentration

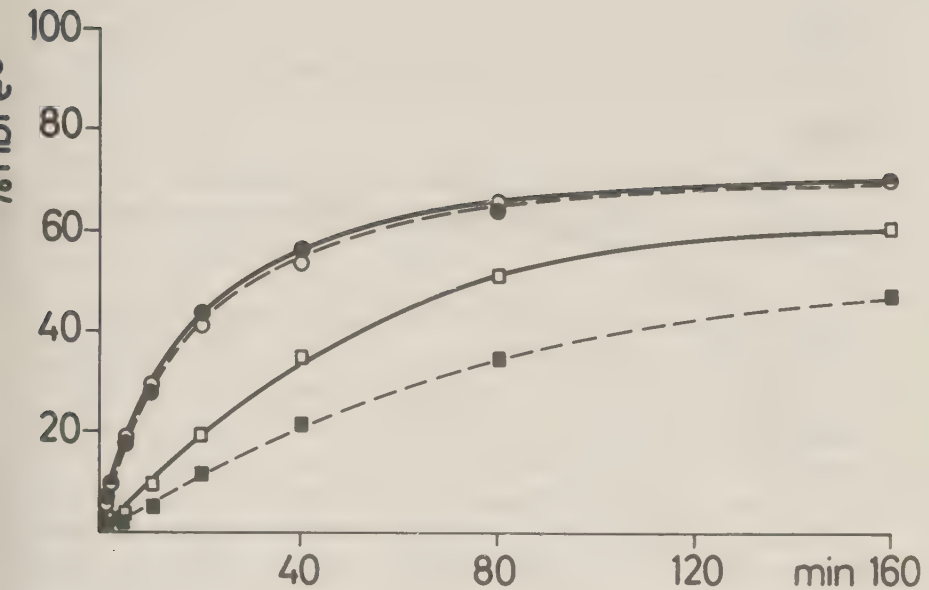


Abb. 15 Einfluß von Glutathion auf die Ferrihämoglobinbildung durch 2- bzw. 4-Aminophenol

Jeweils 0,5 mM 2-Aminophenol (●) bzw. 4-Aminophenol (■) wurden, in Gegenwart reduzierten Glutathions (2 mM), mit gereinigtem Menschenhämoglobin (3 mM HbFe^{2+} in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4) bei 37°C unter Luft inkubiert (----).

Ergebnisse von 2-Aminophenol (○) und 4-Aminophenol (□) ohne Glutathionzusatz (bei sonst gleichen Bedingungen) zeigen die durchgezogenen Kurven.

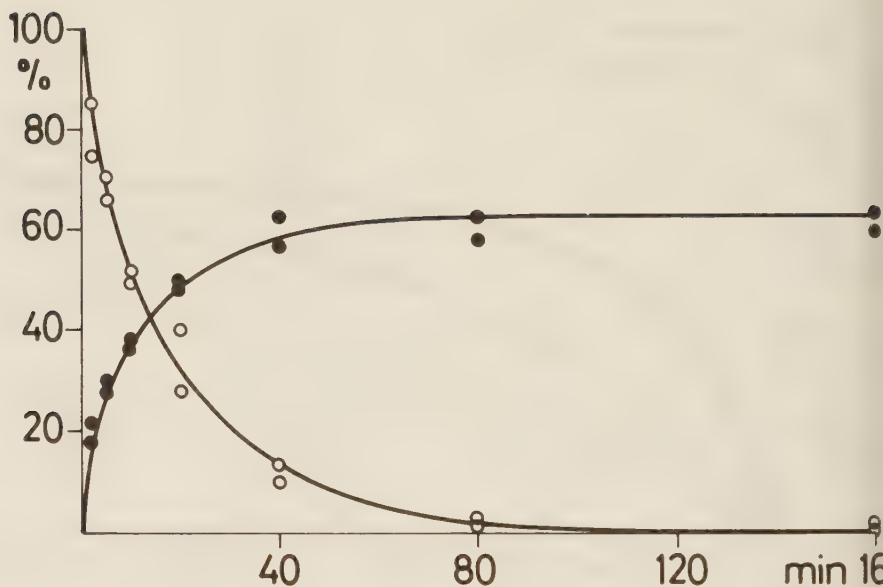


Abb. 16 Einfluß von Glutathion auf die Geschwindigkeit der 2-Aminophenol-Abnahme in Hämoglobin

(^{14}C)2-Aminophenol ($5\text{ }\mu\text{M}$) wurde mit reduziertem Glutathion (2 mM) und gereinigtem Menschenhämoglobin (3 mM in HbFe^{2+} in $0,2\text{ M}$ Phosphatpuffer pH 7,4) bei 37°C unter Luft inkubiert.

- (^{14}C)2-Aminophenol
- Radioaktivität im Überstand (nach Fällung mit Tri-chloressigsäure, $0,6\text{ M}$)

wenig (unter 3%) gebildet. 60% der Aktivität entfielen auf säurelösliche Metabolite.

Abb. 17 zeigt das Elutionsprofil des gleichen Versuchsansatzes nach Chromatographie (Sephadex^R G 75 fine: s. 2.8.); hier waren nur 26% der Aktivität des eingesetzten (^{14}C)2-Aminophenols an Hämoglobin gebunden.

2.10. Einfluß von zugesetztem Lysin und Histidin auf die kovalente Bindung von (^{14}C)2-Aminophenol an Hämoglobin

Bei Zurückdrängen der Phenoxazonbildung im Bereich niedriger 2-Aminophenol-Konzentrationen war eine Reaktion des oxidierten 2-Aminophenols auch mit Aminen denkbar. Wurde 5 μM (^{14}C)2-Aminophenol in Gegenwart von jeweils 2 mM Lysin oder Histidin mit gereinigtem Menschenhämoglobin (3 mM) inkubiert, änderte sich jedoch weder die Geschwindigkeit der Abnahme von 2-Aminophenol, der Bindung an Hämoglobin noch der Bildung des Kondensationsproduktes, 2-Amino-3H-phenoxazin-3on.

2.11. Kovalente Bindung von (^{14}C)2-Aminophenol an Hämoglobin mit blockierten SH-Gruppen

Die Affinität des oxidierten 2-Aminophenols war offensichtlich zu SH-Gruppen des Hämoglobins deutlich größer als zu zugesetztem Lysin oder Histidin. Inwieweit auch andere Aminosäuren des Hämoglobins oxidiertes 2-Aminophenol addieren können, wurde mit folgendem Experiment untersucht.

Da eine durch 5 μM 2-Aminophenol hervorgerufene Abnahme der reaktionsfähigen SH-Gruppen bei 3 mM Hämoglobinkonzentration durch Titration nicht nachweisbar war, wurden, im umgekehrten Verfahren, durch Zugabe von pCMB zu gereinigtem Hämoglobin (3 mM, in 10fachem Überschuß zu HbSH) alle SH-Gruppen blockiert. Derart vorbehandeltes

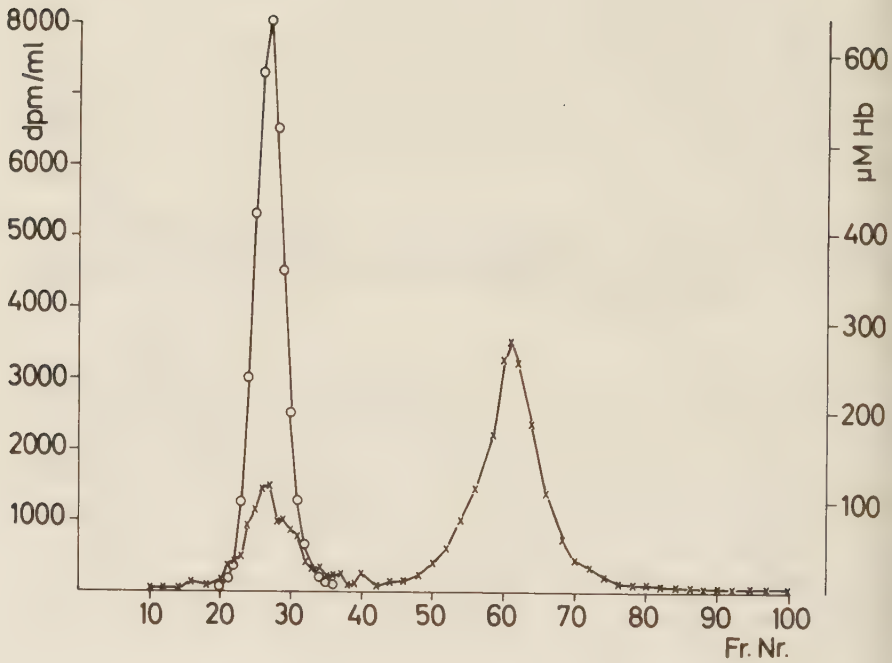


Abb. 17 Elutionsprofil von Hämoglobin und Radioaktivität nach Reaktion von (^{14}C)2-Aminophenol mit Hämoglobin in Anwesenheit von Glutathion

(^{14}C)2-Aminophenol (5 μM) wurde mit reduziertem Glutathion (2 mM) und gereinigtem Menschenhämoglobin (3 mM in HbFe^{2+} in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4) 20 h bei 37°C unter Luft inkubiert und an Sephadex^R G 75 fine (2,5 x 40 cm) mit Phosphatpuffer (2 mM, pH 7,4) bei 4°C chromatographiert.

- x Radioaktivität
- o Hämoglobinkonzentration

Hämoglobin wurde mit 5 μM ^{14}C -markiertem 2-Aminophenol inkubiert.

Abb. 18 zeigt, daß jetzt deutlich weniger Aktivität gebunden wurde (15% gegenüber 75% - nach 160 min). Die Phenoxazonbildung war jedoch nicht vermehrt (6%); offenbar entstanden aus dem oxidierten 2-Aminophenol andere Reaktionsprodukte, die nicht ätherextrahierbar waren; sie wurden nicht weiter untersucht. Die Geschwindigkeit der 2-Aminophenol-Abnahme war hier unabhängig von der SH-Gruppen-Blockade (vgl. Abb. 18 mit 12).

Nach den geschilderten Experimenten verhielten sich die beiden oxidierten Aminophenol-Isomeren sehr ähnlich: sie bevorzugten Additionsreaktionen mit Thiolen gegenüber Aminen. Bei 2-Aminophenol sind jedoch diese Additionsreaktionen nur im niedrigen Konzentrationsbereich nachweisbar, sonst überwiegt die Kondensation zum Phenoxazon.

Verhindert man durch Substitution an den Aminogruppen isomerer Aminophenole aber eine derartige Kondensation, dann sollten ähnliches Verhalten oder Unterschiede zwischen beiden Isomeren auch im höheren Konzentrationsbereich erfaßbar sein.

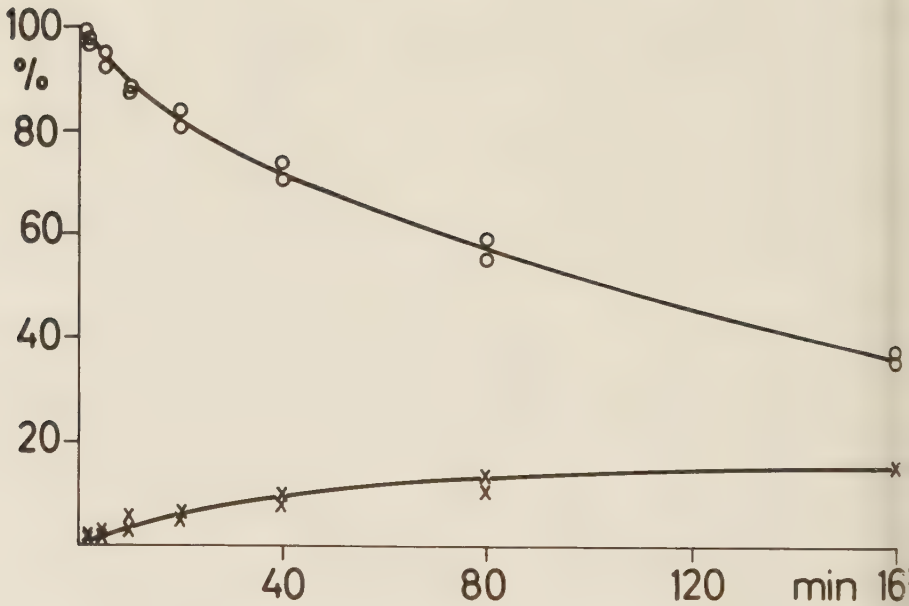


Abb. 18 Geschwindigkeit der Abnahme von 2-Aminophenol und der kovalenten Bindung an Hämoglobin mit blockierten SH-Gruppen

(¹⁴C)2-Aminophenol (5 μ M) wurde mit 3 mM gereinigtem Menschenhämoglobin (SH-Gruppen pCMB-blockiert, 10facher Überschuß zu HbSH, s. Methoden), in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4 bei 37°C unter Luft inkubiert.

- o (¹⁴C)2-Aminophenol
- x präzipitatgebundene Radioaktivität

3. Reaktionen von 2- und 4-Dimethylaminophenol mit Hämoglobin vom Menschen und Hund

3.1. Ferrihämoglobinbildung durch 2- und 4-Dimethylaminophenol

In gereinigtem Menschenhämoglobin bildete 4-Dimethylaminophenol deutlich schneller Ferrihämoglobin als das isomere 2-Dimethylaminophenol. Wie aus Ergebnissen von KIESE u. WEGER (60) sowie GABER (36) bekannt ist, sind diese Unterschiede allerdings sehr stark von der Hämoglobinspezies abhängig. So zeigte sich im Hundevollblut, daß 2-Dimethylaminophenol ca. 40mal schneller als in Menschenvollblut Ferrihämoglobin bildete (37). Deshalb wurden die Reaktionen von 2- und 4-Dimethylaminophenol mit Hämoglobin allein (aus Menschen- und Hundeblood) untersucht.

Abb. 19 zeigt die Ferrihämoglobinbildung durch 0,6 mM Dimethylaminophenol in Hämoglobinlösungen des Menschen und des Hundes. Während 4-Dimethylaminophenol bei beiden Spezies mit annähernd gleicher Geschwindigkeit Ferrihämoglobin bildete, verlief dessen Bildung durch das 2-Dimethylaminophenol auch in Hundehämoglobin-Lösungen erheblich (ca. 20mal) schneller als in gereinigten Menschenhämoglobin-Lösungen.

In Hundehämoglobin-Lösungen bildete 2-Dimethylaminophenol auch deutlich mehr Ferrihämoglobin (ca. 1/3) als 4-Dimethylaminophenol.

3.2. Schicksal der Dimethylaminophenole in Hämoglobinlösungen

Wie die Ferrihämoglobinbildung verlief die Abnahme von 2-Dimethylaminophenol erheblich schneller in Hunde- als in Menschenhämoglobin; bei 4-Dimethylaminophenol fanden sich geringere Unterschiede.

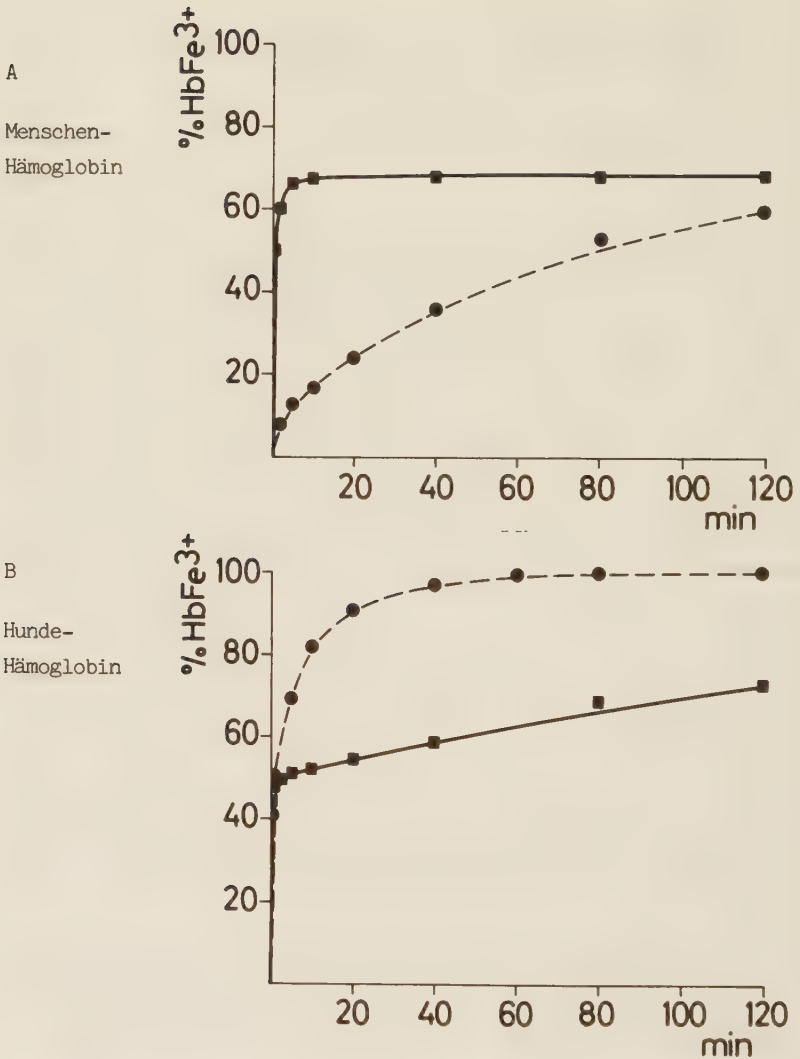


Abb. 19 Ferrihämoglobinbildung durch 2- bzw. 4-Dimethylaminophenol in Hämoglobin des Menschen und Hundes

2-/4-Dimethylaminophenol (●/■), je 0,6 mM, wurden mit gereinigter Menschenhämoglobin- (A) bzw. mit Hundehämoglobin-Lösung (B) bei 37°C unter Luft inkubiert (in 0,2M Phosphat-Puffer pH 7,4; 3 mM HbFe²⁺).

Jeweils 0,6 mM von ^{14}C -markiertem 2- bzw. 4-Dimethylaminophenol wurden mit Menschen- bzw. Hundehämoglobin (3 mM in 0,2 M Phosphatpuffer, pH 7,4) inkubiert. Die Abnahmegeschwindigkeit von beiden Dimethylaminophenolen in Ätherextrakten sowie die verbliebene Radioaktivität im Präzipitat (nach Fällung mit 0,6 M Trichloressigsäure) zeigt Abb. 20. Unabhängig von den in diesem Zusammenhang nicht weiter untersuchten Speziesunterschieden verlief die Abnahme und Proteinbindung bei 2-Dimethylaminophenol zudem deutlich langsamer als bei dem para-Isomeren.

3.3. Reaktionen der Dimethylaminophenole mit SH-Gruppen des Hämoglobins

Bei beiden Dimethylaminophenolen wurden keine äthergängigen oder säurelöslichen Metaboliten gefunden; der Anteil der Radioaktivität im Präzipitat (nach Trichloressigsäure-Fällung) entsprach zu jedem Zeitpunkt dem des fehlenden Dimethylaminophenols. Deshalb wurde geprüft, inwieweit die reaktiven SH-Gruppen der verwendeten Hämoglobine blockiert waren.

Wurde 4-Dimethylaminophenol (0,6 mM) mit gereinigtem Menschenhämoglobin (3 mM) 20 Stunden inkubiert, waren 0,6 mM der Hämoglobin-SH-Gruppen blockiert. Unter gleichen Versuchsbedingungen blockierte 2-Dimethylaminophenol nur 0,35 mM SH-Gruppen, obwohl 0,50 mM 2-Dimethylaminophenol umgesetzt waren.

Daher wurde der Versuch unternommen, durch vollständige vorherige Blockade aller SH-Gruppen durch pCMB (zugegeben in 10fachem Überschuß) dem 2-Dimethylaminophenol diese möglichen Reaktionspartner zu entziehen. Nach Inkubation von 0,6 mM (^{14}C)2-Dimethylaminophenol mit derart vorbehandeltem Hundehämoglobin (3 mM nach Dialyse) wurde 2-Dimethylaminophenol (im Vergleich zum unbehandelten Hämoglobin) etwas langsamer abgebaut und weniger

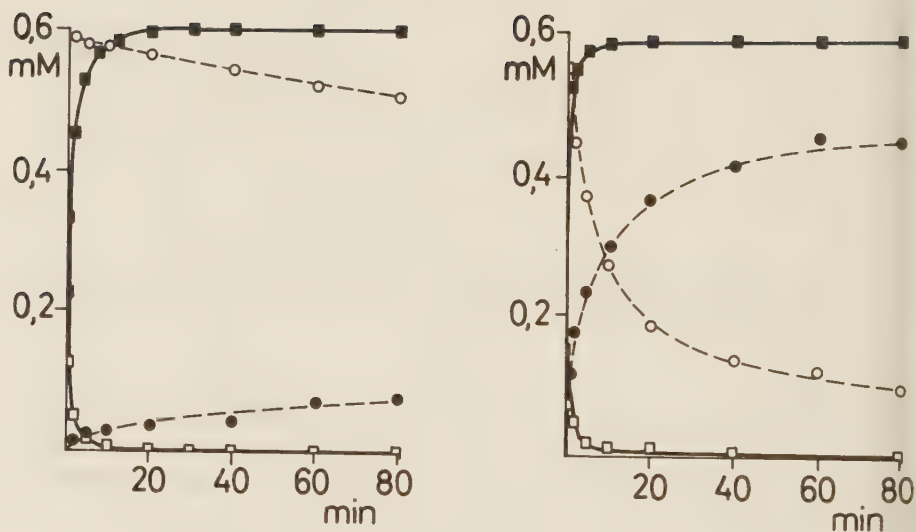


Abb. 20 Geschwindigkeit der Abnahme von 2- und 4-Dimethylaminophenol und deren kovalenter Bindung an Hämoglobin vom Menschen und Hund

^{14}C -markiertes 2- bzw. 4-Dimethylaminophenol (2-/4-DMA), je 0,6 mM, wurden mit gereinigter Menschenhämoglobin- (Abb. links) bzw. mit Hundehämoglobin-Lösung (Abb. rechts) unter Luft bei 37°C inkubiert (3 mM HbFe^{2+} in 0,2M Phosphatpuffer pH 7,4).

2-DMA:	○ ätherextrahierbar	● präzipitatgebunden
4-DMA:	□ ätherextrahierbar	■ präzipitatgebunden

Radioaktivität gebunden (Abb. 21). Die Unterschiede waren aber gering: nach 80 min waren 0,43 mM 2-Dimethylaminophenol umgesetzt und 0,37 mM gebunden: offensichtlich band oxidiertes 2-Dimethylaminophenol nicht nur an SH-Gruppen des Hundehämoglobins.

3.4. Einfluß von zugesetztem Glutathion auf Reaktionen von Dimethylaminophenolen mit Hämoglobin

Nachdem reduziertes Glutathion Reaktionen der nichtsubstituierten Aminophenol-Isomeren unterschiedlich beeinflußt hatte (vgl. 2.9.), sollte der Einfluß des Glutathions auf Ferrihämoglobinbildung und Schicksal auch beider Dimethylaminophenole verglichen werden.

4-Dimethylaminophenol (0,6 mM) bildete in gereinigtem Menschenhämoglobin (3 mM) in Anwesenheit von 2 mM reduziertem Glutathion nur etwa die Hälfte Ferrihämoglobin; dabei wurde aber die halbmaximale Menge wie in der Kontrolle in weniger als 0,5 min gebildet.

Wesentlich geringer war der Einfluß von Glutathion bei der Ferrihämoglobinbildung durch 2-Dimethylaminophenol, Abb. 22.

Den Verbleib von ^{14}C -markiertem 2- und 4-Dimethylaminophenol (jeweils 0,6 mM) nach Zusatz reduzierten Glutathions (2 mM) zu gereinigtem Menschenhämoglobin (3 mM) zeigt Abb. 23. In beiden Experimenten wurde die Abnahme der Dimethylaminophenole durch Glutathion beschleunigt; bei 2-Dimethylaminophenol war der Einfluß jedoch geringer als bei dem para-Isomeren. Dabei konnte die Bindung des (^{14}C)2-Dimethylaminophenols an Hämoglobin durch Glutathion nahezu, von (^{14}C)4-Dimethylaminophenol vollständig verhindert werden: nur 0,05 mM (^{14}C)2-Dimethylaminophenol wurden nach 6 Stunden präzipitatgebunden bestimmt.

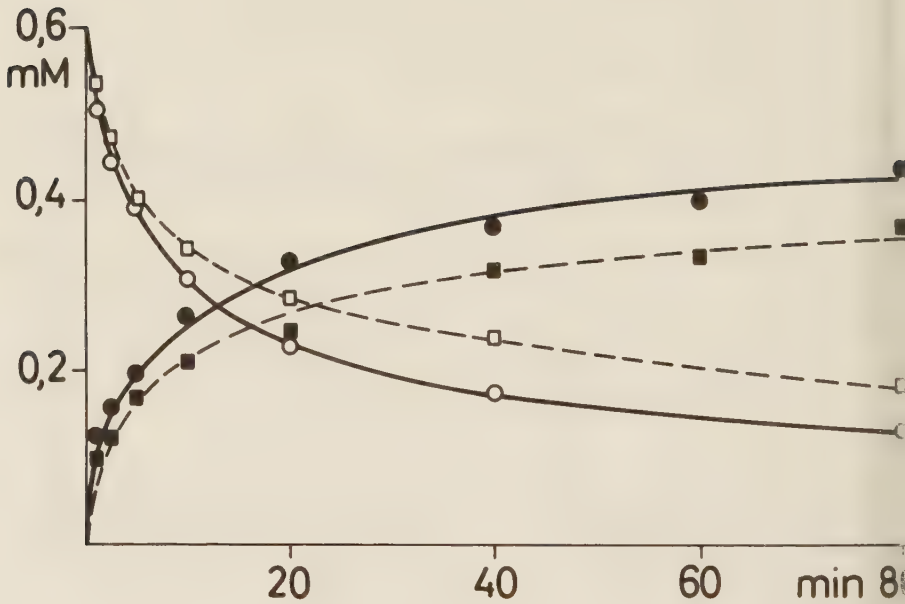


Abb. 21 Geschwindigkeit der 2-Dimethylaminophenol-Abnahme und dessen kovalenter Bindung an Hundehämoglobin mit blockierten SH-Gruppen

^{14}C -markiertes 2-Dimethylaminophenol (2-DMAP, 0,6 mM) wurde in Hundehämoglobinlösung (3 mM HbFe^{2+} in 0,2 M Phosphatpuffer, pH 7,4) mit freien HbSH- (durchgezogene Kurven) sowie pCMB-blockierten HbSH-Gruppen (durchbrochene Kurven) unter Luft bei 37°C inkubiert.

HbSH frei:	2-DMAP	○	ätherextrahierbar
		●	präzipitatgebunden
HbSH blockiert:	2-DMAP	□	ätherextrahierbar
		■	präzipitatgebunden

2-Dimethylaminophenol

4-Dimethylaminophenol

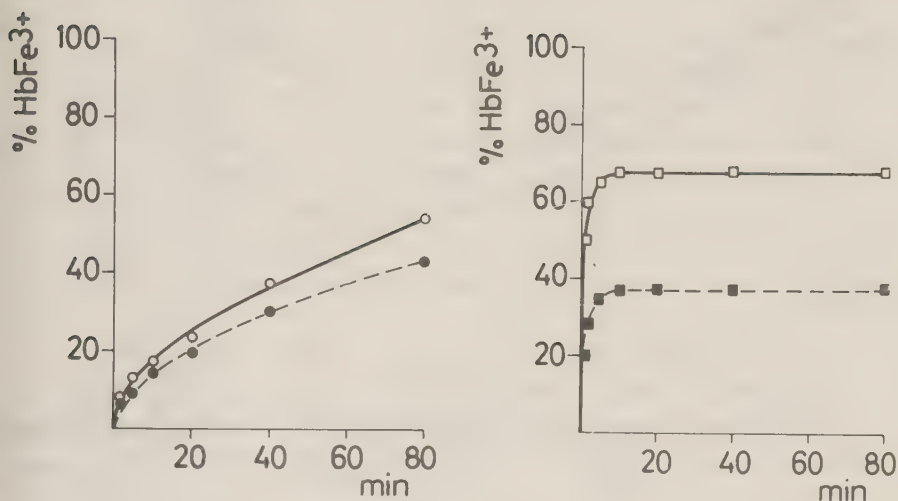


Abb. 22 Einfluß von Glutathion auf die Ferrihämoglobinbildung durch 2- bzw. 4-Dimethylaminophenol in Hämoglobin vom Menschen

2-Dimethylaminophenol (Abb. links) und 4-Dimethylaminophenol (Abb. rechts) wurden in Lösungen von gereinigtem Menschenhämoglobin (3 mM HbFe²⁺; 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4) in Anwesenheit von 2 mM reduziertem Glutathion bei 37°C unter Luft inkubiert (durchgezogene Kurven).

Die Ferrihämoglobinbildung ohne Glutathionzusatz zeigen die durchgezogenen Kurven.

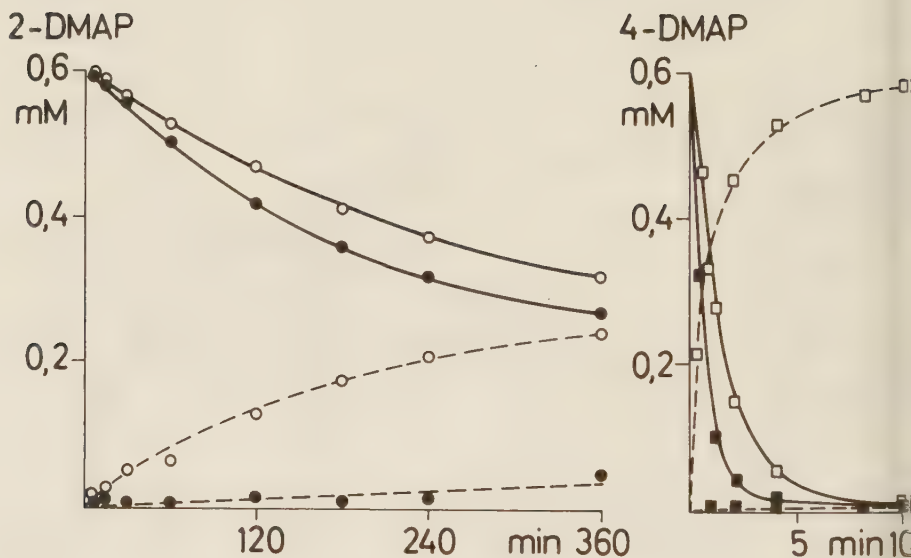


Abb. 23 Einfluß von Glutathion auf die Geschwindigkeit der 2- und 4-Dimethylaminophenol-Abnahme und deren kovalenter Bindung an Hämoglobin vom Menschen

^{14}C -markiertes 2- bzw. 4-Dimethylaminophenol (2-DMAP/4-DMAP, jeweils 0,6 mM) wurde in Lösungen gereinigten Menschenhämoglobins (3 mM HbFe $^{2+}$ in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4) allein (○, □) sowie in Gegenwart von zusätzlich 2 mM reduziertem Glutathion (●, ■) bei 37°C unter Luft inkubiert. Durchgezogene Kurven zeigen den ätherextrahierbaren, durchbrochene Kurven den präzipitatgebundenen Anteil der Isomeren des Dimethylaminophenols.

DISKUSSION

Die vorliegende Untersuchung hat gezeigt, daß ortho- und para-Aminophenole in ihren Reaktionen mit Hämoglobin viele Gemeinsamkeiten aufweisen: 2- und 4-Aminophenole werden durch den aktivierten Sauerstoff (17) im Oxyhämoglobin oxidiert; ihre Oxidationsprodukte bilden Ferrihämoglobin, wobei sie selbst wieder reduziert werden. Aminophenole übertragen somit als Katalysator Elektronen vom Hämoglobineisen auf Sauerstoff und bewirken die Oxidation einer vielfach stöchiometrischen Menge an Hämoglobineisen (42, 32).

Die schon von HEUBNER (41, 32) inaugurierte Ferrihämoglobinbildung scheint für alle Aminophenole zuzutreffen, die eine Chinoniminstruktur ausbilden können (53). Diese katalysierte Ferrihämoglobinbildung wird jedoch durch Nebenreaktionen beendet, bei denen der Katalysator verbraucht wird. Dabei zeigen 2- und 4-Aminophenole unterschiedliches Verhalten.

Phenoxazonbildung bei ortho-Aminophenolen: Hauptunterschied bei den Reaktionen isomerer Aminophenole

Für 4-Aminophenole konnten EYER et al. (31, 32) am Beispiel des 4-Dimethylaminophenols eine schnelle Beendigung des Redoxprozesses zeigen. In Lösungen gereinigten Hämoglobins wurde 4-Dimethylaminophenol quantitativ kovalent an Hämoglobin gebunden. Dagegen können 2-Aminophenole mit primärer Aminogruppe nach der Oxidation zum ortho-Chinonimin in einer Kondensationsreaktion Phenoxazone bilden (Übersicht bei SCHÄFER, 84). Hierdurch könnte die katalytische Ferrihämoglobinbildung beendet werden.

Nach der ersten Entdeckung des 2-Amino-3H-phenoxazin-3on aus 2-Aminophenol durch FISCHER u. JONAS (35) sind neben Untersuchungen über chemische Eigenschaften (68, 66, 70, 46, 85) zahlreiche Biosynthesen dieses Phenoxazons beschrieben (15, 18, 63, 73, 72, 38, 37, 74, 90, 4). NAGASAWA et al. berichteten über die Entstehung von Phenoxazonen aus ortho-Aminophenolen in Leber- und Nierenmikrosomen der Ratte (bei Anwesenheit von Cytochrom c und Cytochromoxidase) und formulierten Phenoxazonbildung aus Chinoniminen als den Zwischenprodukten (73, 71, 72). Diese Arbeitsgruppe vermutete, daß bei freier Position para zur phenolischen Hydroxylgruppe die Dimerisation im Vergleich zu Additionsreaktionen überwiegt; es wurden jedoch keine quantitativen Daten angegeben (38).

Untersuchungen über Kondensationsreaktionen von oxidiertem 2-Aminophenol in Hämoglobinlösungen sind nicht bekannt. Das in den hier beschriebenen Versuchen aus Inkubaten von Hämoglobin mit 2-Aminophenol erhaltene 2-Amino-3H-phenoxazin-3on war mit dem von NAGASAWA et al. (73, 72) gleichfalls aus 2-Aminophenol gewonnenen Produkt in allen Charakteristika identisch.

Aus 2-Hydroxyphenetidin konnte das entsprechende Phenoxazon, 2-Amino-7-ethoxy-3H-phenoxazin-3on, isoliert werden. Erstmals vermutlich dargestellt von HENRICH u. SCHIERENBERG (40) aus 2-Hydroxyphenetidin in alkalischer Lösung, wurde der Farbstoff von BÜCH et al. (13, 14) später ausschließlich zur Bestimmung von 2-Hydroxyphenetidin genutzt, das man bei den Untersuchungen des Phenacetinstoffwechsels (im Urin von Ratten) gefunden hatte. Eine exakte Charakterisierung der Verbindung, wie sie hier gegeben wird (vgl. Material), findet sich allerdings weder bei den oben genannten Autoren noch anderweitig.

Phenoxazone sind selbst schwache Ferrihämoglobinbildner

Beide Phenoxazone fielen in Hämoglobinlösungen bei mM-Konzentrationen der 2-Aminophenole in guten Ausbeuten an. Sie sind in Hämoglobinlösungen unter Luftsauerstoff wesentlich stabiler als ihre Muttersubstanzen (Abb. 11) und bilden selbst nur langsam Ferrihämoglobin (Abb. 5, 11). Die nur geringfügige Abnahme von 2-Amino-3H-phenoxazin-3on um weniger als 1% in drei Stunden ist wahrscheinlich auf Umlagerungsprozesse des Phenoxazons zu entsprechenden Triphenidioxazinen zurückzuführen (68). Im übrigen fand sich diese langsame Konzentrationsabnahme auch in den Dioxan-Stammlösungen des Phenoxazons innerhalb einer Woche.

Immerhin kann die langsame Bildung von Ferrihämoglobin durch 2-Amino-7-ethoxy-3H-phenoxazin-3on die beobachtete, biphasische Kinetik bei 2-Hydroxyphenetidin erklären: wenn nach 20 min Reaktion das gesamte 2-Hydroxyphenetidin verbraucht war (Abb. 6), lief die Ferrihämoglobinbildung zwar verlangsamt, aber weitgehend linear weiter (Abb. 4). Die zweite Phase der Ferrihämoglobinbildung entsprach hierbei der durch 2-Amino-7-ethoxy-3H-phenoxazin-3on allein (Abb. 5).

Abhängigkeit der Phenoxazonbildung von der 2-Aminophenol-Konzentration

Diese Kondensationsreaktion zum Phenoxazon überwog bei 2-Aminophenol-Konzentrationen über 0,2 mM; so wurden bei der Reaktion von 2 mM 2-Aminophenol mit Hämoglobin über 90% 2-Amino-3H-phenoxazin-3on gebildet. Bei niedrigen 2-Aminophenol-Konzentrationen wurde diese Reaktion dagegen zurückgedrängt: bei 2 μ M 2-Aminophenol entstanden nurmehr 7% 2-Amino-3H-phenoxazin-3on (vgl. Abb. 13).

Dieses Ergebnis bestätigte die theoretische Überlegung,

daß der Anteil des gebildeten Phenoxazons mit der Konzentration von 2-Aminophenol zunehmen sollte, da die Geschwindigkeit der Phenoxazonbildung vom Quadrat der 2-Aminophenol-Konzentration abhängen dürfte.

Additionsreaktionen der Chinonimine mit Thiolen

Bei niedrigen Konzentrationen von 2-Aminophenol überwo-gen solche Nebenreaktionen, wie sie für 4-Aminophenole charakteristisch sind: Addition des gebildeten Chinonimins an Nukleophile, besonders jedoch an Thiole (31, 32, 30); so reagierten in Lösungen von gereinigtem Menschenhämoglobin vor allem die exponierten Cysteinreste der β -Ketten in Position 93, die als einzige einer SH-Gruppen-Titration mit pCMB zugänglich sind (1), mit dem 4-Dimethylaminophenol.

Ortho-Aminophenole zeigten hier ähnliches Verhalten: bei sehr geringer Konzentration konnte der kovalent gebundene Anteil durch vorherige Hämoglobin-SH-Gruppen-Blockade (vgl. Abb. 12 mit 18) wie auch durch Zugabe von reduziertem Glutathion vermindert werden (vgl. Abb. 14 mit 17). Dieser kompetitive Effekt des Glutathions wurde auch mit 2-Hydroxyphenetidin (vgl. 1.7., Tab. 5) und 2-Dimethylaminophenol (vgl. 3.4., Abb. 23) beobachtet, wobei auch der Anteil an Gesamtglutathion abnahm. In beiden Fällen wurde eine Bindung an Hämoglobin fast vollständig verhindert; gleichzeitig wurde die Abnahme von 2-Dimethylaminophenol beschleunigt, wie es bereits vom para-Isomer bekannt war (30).

4-Aminophenol und 4-Dimethylaminophenol reagierten wesentlich ausgeprägter mit Thiolen als ihre ortho-Isomeren: etwa 1 mM 4-Aminophenol waren nach 60 min Inkubation verbraucht und 0,9 mM Hämoglobin-SH-Gruppen blockiert (vgl. Tab. 6); auch bestätigte die Blockade einer - nach vollständigem Umsatz von 0,6 mM 4-Dimethylamino-

phenol - äquivalenten Menge von Hämoglobin-SH-Gruppen (vgl. 3.3.) frühere Ergebnisse (25); Glutathion konnte auch hierbei kompetitiv eine Bindung an die Hämoglobin-SH-Gruppen verhindern, wobei mehr als ein Äquivalent an Gesamtglutathion verbraucht wurde (vgl. Tab. 7 und 8).

Früher schon hatten EYER u. KIESE (30) gezeigt, daß an ein 4-Dimethylaminophenol-Molekül bis zu drei Glutathionreste addiert werden können. Bei hohen Glutathionkonzentrationen findet so durch Additionsreaktionen eine Unterbrechung des katalytischen Prozesses als echte Entgiftungsreaktion statt.

Ähnliche Additionsreaktionen wurden auch von HADLER u. ERWIN (39) bei der Reaktion von 2,6-Dichlorindophenol mit Cystein beschrieben. Hierbei wurde angenommen, daß intermediär entstehende Thioäther erneut zur Chinoniminform oxidiert werden und ein weiteres Thiol addieren. Ob derartige Thioäther auch aus 2-Aminophenolen mit mehreren Glutathionresten gebildet werden, kann derzeit nicht beantwortet werden und ist Fragestellung einer eigenen Studie.

Die geringere Affinität der ortho-Chinonimine zu Thio-
len zeigt sich auch bei der Ferrihämoglobinbildung in Gegenwart von Glutathion. So ist bei Anwesenheit von reduziertem Glutathion die Ferrihämoglobinbildung durch 2-Dimethylaminophenol nur geringfügig vermindert (im Gegensatz zu 4-Dimethylaminophenol, 3.4., Abb. 22), bei 2-Aminophenol unbeeinflusst (Abb. 15) und bei 2-Hydroxyphenetidin sogar vermehrt (Abb. 7). In den Versuchen mit 2-Hydroxyphenetidin kann durch Glutathion selbst die Steigerung der Ferrihämoglobinbildung verursacht sein: reduziertes Glutathion wird in Oxyhämoglobin-Lösungen unter Superoxidradikal- und Wasserstoffperoxid-Bildung autooxidiert (27), wodurch in gereinigten Häm-

globinpräparaten (Fehlen von Katalase und Glutathionperoxidase) weiteres Ferrihämoglobin entsteht.

Hierbei stellte sich die Frage, ob nicht die Thioäther des 2-Hydroxyphenetidins selbst Ferrihämoglobin bilden können. Bei den Reaktionen des 4-Dimethylaminophenols mit Glutathion entstanden bei Überschuß von 4-Dimethylaminophenol nämlich Thioäther, die mehr Ferrihämoglobin bildeten als die Aminophenolverbindung selbst (30). Die Ausbeute an Ferrihämoglobin durchlief so ein Maximum bei äquivalenter Glutathionkonzentration und war bei Glutathionüberschuß vermindert. Jedoch erscheint ein derartiger Mechanismus für 2-Hydroxyphenetidin unwahrscheinlich, da die Steigerung der Ferrihämoglobinbildung in Abhängigkeit zur Glutathionkonzentration stetig verläuft.

Additionsreaktionen der Chinonimine mit primären Aminogruppen

Neben Reaktionen mit Thiolen sind andere Additionsreaktionen von ortho-Chinoniminen auch z.B. an Plasmaproteine berichtet worden (73, 71, 72, 38, 7, 62, 61, 63), wobei Ort, Mechanismus sowie Ausmaß der Bindung nicht weiter untersucht worden waren.

KING et al. (62) sahen eine deutliche Verminderung der Bindung von oxidiertem 2-Amino-1-fluorenol an Albumin nach dessen Acetylierung, nicht aber nach pCMB-Behandlung und schlossen daher auf eine bevorzugte Reaktion mit den ϵ -Aminogruppen des Lysins; HADLER u. ERWIN (39) fanden dagegen bei Untersuchungen mit 2,6-Dichlorindophenol keine Reaktionen mit zahlreichen Aminosäuren außer mit Thiolen.

Für die hier untersuchten ortho-Verbindungen scheinen Additionsreaktionen mit Aminogruppen keine wesentliche Rolle zu spielen. So konnten zugesetzte basische Aminosäuren (wie Lysin und/oder Histidin) eine Reaktion der ortho-Chinonimine weder mit den Hämoglobin-SH-Gruppen noch mit zugesetztem reduziertem Glutathion verhindern. Die Konzentrationen der beiden Aminosäuren wurden nicht vermindert (Tab. 5, 7, 8). Nach Ausschluß der bevorzugten nukleophilen Akzeptoren durch pCMB-Blockade fand jedoch eine kovalente Bindung offenbar auch an andere Aminosäurereste des Hämoglobins statt; diese war gering ausgeprägt bei 2-Aminophenol (Abb. 18), dagegen deutlich bei 2-Dimethylaminophenol (Abb. 21). Wenn auch ein direkter Vergleich der Reaktivität beider Aminophenole hier nicht gezogen werden kann, da mit verschiedenen Hämoglobinen gearbeitet wurde, so ist es doch unwahrscheinlich, daß nach SH-Gruppenblockade derart große Unterschiede in der Hämoglobinspezies zu suchen sind.

Speziesunterschiede bei der Reaktion von Hämoglobin mit Aminophenolen

Bei der Ferrihämoglobinbildung durch 2-Dimethylaminophenol (Abb. 19) bestehen dagegen erstaunliche Speziesunterschiede. KIESE u. WEGER (60) sowie GABER (36) berichteten, daß im Vollblut von Hunden 2-Dimethylaminophenol viel schneller als in Menschenblut Ferrihämoglobin bildete. Bei 4-Dimethylaminophenol war der Unterschied dagegen minimal.

Diese Speziesunterschiede treffen nach den vorliegenden Ergebnissen auch für gereinigte Hämoglobin-Lösungen zu; sie sind auch nach Blockade der Hämoglobin-SH-Gruppen vorhanden. Unterschiedlich schnelle Ferrihämoglobin-Reduktion oder speziesdifferenten Nebenreaktionen, wie Bindung an Hämoglobin oder Glutathion, sind hiernach unwahrscheinlich (Abb. 21, 23). Sauerstoffaffinitäts-

unterschiede einzelner Hämoglobinspezies wurden früher schon als Ursache ausgeschlossen (6).

Eher scheint die Oxidation des 2-Dimethylaminophenols durch Oxyhämoglobin vom Menschen sterisch behindert zu sein, sodaß hieraus eine deutliche Verlangsamung der Abnahme von 2-Dimethylaminophenol wie auch der Ferrihämoglobinbildung resultieren (Abb. 19, 20). Zwar kann diese Annahme sterischer Einflüsse mechanistisch nicht völlig erklärt werden; sie scheint dennoch naheliegend, da die Primärstruktur zwischen Menschen- und Hundehämoglobin in den Häm-benachbarten Kettenabschnitten deutliche Unterschiede aufweist. Die Bedeutung dieser Aminosäurereste für den Zutritt zum Hämoglobineisen konnte für eine Vielzahl von Liganden nachgewiesen werden; so ergaben Untersuchungen mit Nitrosobenzol, daß eine Substitution in ortho- bzw. para-Stellung die Affinität deutlich veränderte (1, 45).

Sterische Einflüsse könnten auch frühere Befunde über speziesverschiedene Ferrihämoglobinbildung durch ortho- und para-Aminophenole erklären (41, 3, 54, 55, 59). Offenbar sind große Speziesunterschiede nicht typisch für die ortho-Stellung der Aminophenole an sich.

Dagegen läßt eine gleichzeitige Aminosubstitution Speziesdifferenzen deutlich hervortreten: so sind zwischen 2-Aminophenol und 2-Hydroxyphenetidin in Hämoglobin-Lösungen geringere Speziesunterschiede gegenüber 2-Dimethylaminophenol festzustellen.

2-Hydroxyphenetidin als potentieller Ferrihämoglobinsbildner nach Phenacetin

Die von KIESE u. WEGER (60) beschriebene schwache Ferrihämoglobinbildung durch 2-Hydroxyphenetidin wird mit den hier vorgelegten Ergebnissen nicht bestätigt; sowohl in vitro (Hundeerythrozyten, Menschenhämoglobin)

als auch in vivo (Hund) erwies sich 2-Hydroxyphenetidin als schneller Ferrihämoglobinbildner.

Diese Befunde decken sich mit Ergebnissen von SHAHIDI et al. (88, 86, 87) und unterstreichen damit die mögliche Bedeutung dieses Phenacetinmetaboliten (89, 13) als Ferrihämoglobinbildner nach Phenacetin-Überdosierung (44, 64, 65). DUBACH u. RAAFLAUB (23) konnten anhand eindeutiger Verschiebungen im Phenacetinmetabolitenmuster zeigen, daß bei hohen Phenacetindosen 2-Hydroxyphenetidin überproportional ausgeschieden wurde.

Dosisabhängige Unterschiede der Ferrihämoglobinbildung durch 2-Hydroxyphenetidin und 4-Nitrosophenetol

Es kann jedoch noch nicht entschieden werden, welche Rolle zusätzlich N-Hydroxyphenetidin bzw. 4-Nitrosophenetol, das in gekoppelter Oxidation mit Oxyhämoglobin gebildet und durch das Methämoglobin-Reduktase-System wieder reduziert wird (57, 58), bei der Ferrihämoglobinbildung nach Phenacetin in vivo zukommt; BAADER et al. (3) schon sahen 4-Nitrosophenetol nicht als ausschließlichen Ferrihämoglobinbildner. Zweifellos ist die steady-state-Konzentration der Oxygenierungsprodukte mitentscheidend: so bildete bei niederen Konzentrationen 2-Hydroxyphenetidin, bei höheren N-Hydroxyphenetidin mehr Ferrihämoglobin (Abb. 2, 3).

Für 2-Hydroxyphenetidin können diese ungewöhnlichen Dosis-Wirkungsbeziehungen dadurch erklärt werden, daß bei höheren Konzentrationen des eigentlichen Ferrihämoglobinbildners 3-Ethoxy-6-imino-2,4-cyclohexadien-1-on die Phenoxazonbildung, als Nebenreaktion, überproportional zunimmt.

Bei der Ferrihämoglobinbildung durch 4-Nitrosophenetol

werden dagegen schnell Addukte mit dem intraerythrozytären Glutathion gebildet (22). Hierdurch wird bei niedrigen Konzentrationen von 4-Nitrosophenetol die Ferrihämoglobinbildung eingeschränkt. Wird die Kapazität dieser Inaktivierungsreaktionen nun überschritten, resultiert eine gesteigerte Ferrihämoglobinbildung.

Unterschiedliche Einflüsse der Stellungsisomerie auf Reaktionen von Aminophenolen in Hämoglobinlösungen oder Erythrozytensuspensionen

Die unterschiedliche Ferrihämoglobinbildung durch 2- bzw. 4-Aminophenol ist durch HEUBNER (41) seit 1913 bekannt. Unterschiede in der Kinetik zwischen Vollblut und Hämoglobin-Lösungen gehen auch aus diesen alten Arbeiten hervor, wurden jedoch nicht diskutiert. In Erythrozytensuspensionen ist dabei der Unterschied in der Geschwindigkeit zwischen beiden Isomeren erheblich ausgeprägter als in Lösungen gereinigten Hämoglobins (vgl. Abb. 8).

Durch die inhomogene Verteilung des Hämoglobins in der Erythrozytensuspension ist der Hämoglobingehalt am Reaktionsort ca. siebenmal höher als in Lösung. Da die Geschwindigkeit der Oxidation des 2-Aminophenols stark von der Hämoglobinkonzentration abhängt (Abb. 9), wird die Ferrihämoglobinbildung in der konzentrierteren Hämoglobinlösung innerhalb des Erythrozyten beschleunigt.

Bei 4-Aminophenol ist der Einfluß der Hämoglobinkonzentration auf die Oxidation der Verbindung zwar ebenfalls vorhanden (54), jedoch schwächer ausgeprägt (Abb. 10). Zusätzlich fängt in der Erythrozytensuspension intraerythrozytäres Glutathion oxidiertes 4-Aminophenol unter Thioätherbildung (26) ab (Abb. 15), daher resultiert in diesem Fall eine insgesamt geringere Ferrihämoglobin-Bildungsgeschwindigkeit.

Schließlich dürften diese verschiedenen Reaktionsweisen der untersuchten Aminophenole auch außer ihrer Ferrihä-moglobinbildung von toxikologischem Interesse sein. So scheinen die zur Phenoxazonbildung befähigten 2-Aminophenole sich nach ihrer "Giftung" zu ortho-Chinoniminen durch eine Kondensationsreaktion selbst zu entgiften. Dieser Entgiftungsmechanismus wird vor allem bei höheren 2-Aminophenol-Konzentrationen wirksam (Abb. 13). Dadurch wird die Kapazität anderer entgiftender Mechanismen wie Thioätherbildung mit Glutathion (11, 67, 24) oder Bindung an Proteine weniger belastet.

In diesem Zusammenhang scheint die Frage von Bedeutung, ob die Phenoxazon-Kondensation aus 2-Aminophenolen an das Vorhandensein spezifischer "Synthasen" gebunden ist, wie von einigen Autoren (51, 74, 90) postuliert wurde. Auch PFEIFER et al. (77) verwiesen dabei auf die Möglichkeit der Autoxidation von 2-Aminophenol in Abwesenheit biologischen Materials und wollten sich auf eine nur enzymatisch katalysierte Entstehung nicht festlegen. Die hier erhobenen Befunde erlauben jedoch einzig die Annahme von Oxyhämoglobin als katalysierendem Agens der Kondensationsreaktion. So konnte die Menge an 2-Amino-7-ethoxy-3H-phenoxazin-3on aus Hämoglobininkubaten mit 2-Hydroxyphenetidin unter einer Atmosphäre von 80% Kohlenmonoxid und 20% Sauerstoff stark vermindert werden. Dieser Befund sowie die Abhängigkeit der Phenoxazonbildung von der Oxyhämoglobinkonzentration sprechen gegen eine reine Autoxidation.

Andererseits schließt die Hemmbarkeit der Phenoxazonbildung durch Kohlenmonoxid sowie die fehlende Empfindlichkeit des Systems auf pCMB den Einfluß eines eigenen Flavoproteins aus. Nach den Befunden von NAIR u. VAI-DYANATHAN (74) wirkt pCMB stark hemmend auf diese "Synthase". Ein Vergleich der Abnahmegeschwindigkeit des

2-Aminophenols in unbehandeltem mit der in pCMB-blokiertem Hämoglobin ließ keinen eindeutigen Unterschied erkennen (vgl. Abb. 12 mit 18).

Fehlende Korrelation zwischen Ferrihämoglobinbildung und kovalenter Bindung

Häufig ist der Versuch unternommen worden, die Toxizität reaktiver Metabolite über ihre Ferrihämoglobinbildung in vivo aufzuspüren (76, 81). Eine Korrelation zwischen Ferrihämoglobinämie und systemischer Toxizität im Sinne eines "Drug Monitoring" ist jedoch fragwürdig (76, 56, 94). Für 2-Aminophenol und 2-Hydroxyphenetidin würde ein solcher Versuch auch falsch positive Ergebnisse liefern; beide ortho-Aminophenole sind zwar in vivo kräftige Ferrihämoglobinbildner; bei vergleichenden Studien über die Nephrotoxizität von Aminophenolen (CALDER et al., 16) erwiesen sie sich jedoch als relativ untoxisch. Wesentlich toxischer war 4-Aminophenol nach dieser Studie; der Grad der Nephrotoxizität stimmte auch hier mit dem Ausmaß der Proteinbindung in diesem Organ überein (21).

Hier sollte ein Aspekt allerdings nicht übersehen werden: auch bei 2-Aminophenol überwiegt im niedrigen Dosisbereich die kovalente Proteinbindung. Die dauernde Zufuhr niedriger Dosen könnte dadurch zu höherer kovalenter Bindung führen als die Aufnahme der gleichen Gesamtmenge auf einmal. Dies sollte bei der Risikobeurteilung von Schwellendosen während Langzeitexposition berücksichtigt werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Aromatische Amine sind für viele toxische und kanzerogene Wirkungen im Organismus verantwortlich. Kenntnisse der Aktivierungs- und Inaktivierungsreaktionen sind daher von Bedeutung und erleichtern die Risikobeurteilung.

Bei der Untersuchung des Phenacetinstoffwechsels waren ferrihämoglobinbildende Produkte gefunden worden; dabei schien die Methämoglobinämie gleichzeitig auch als Indikator für die Organtoxizität dieser reaktiven Metabolite brauchbar.

Zwei der Phenacetinmetaboliten, 2-Hydroxyphenetidin und 4-Nitrosophenetol, sollten daher im Hinblick auf ihre methämoglobinbildenden Fähigkeiten verglichen werden. Dabei erwies sich in vivo (Hund) 2-Hydroxyphenetidin in niedriger Dosis als schneller Ferrihämoglobinbildner, war dem Nitrosoaren jedoch unterlegen. In vitro bildete dagegen 2-Hydroxyphenetidin sowohl in Erythrozytensuspensionen als auch mit gereinigtem Hämoglobin ca. fünfmal schneller Ferrihämoglobin als 4-Nitrosophenetol.

Die - besonders in gereinigtem Hämoglobin - auffallende biphasische Kinetik (initial rasche, dann langsame stetige Zunahme von Ferrihämoglobin) konnte auf einen weiteren Metaboliten zurückgeführt werden: das Kondensationsprodukt aus zwei ortho-Chinonimin-Molekülen des 2-Hydroxyphenetidins, 2-Amino-7-ethoxy-3H-phenoxazin-3on.

Dieser aktive Metabolit, der chemisch rein dargestellt und umfassend charakterisiert wurde (Schmelzpunkt, UV-, VIS-, IR-, NMR- und Massenspektren), bildete selbst mehrere Äquivalente Ferrihämoglobin und erklärt somit

die langsame, zweite Phase der Ferrihämoglobinbildung nach völliger Umsetzung des 2-Hydroxyphenetidins.

^{14}C -markiertes 2-Hydroxyphenetidin, aus (^{14}C)Phenacetin mit Hilfe rezirkulierender Leberperfusion dargestellt, wurde im Gegensatz zu anderen Aminophenolen nur geringgradig kovalent an die Hämoglobin-SH-Gruppen gebunden.

Tatsächlich ergaben weitere Versuche mit den 2-/4-Isomeren von Aminophenol wie auch von Dimethylaminophenol, daß para-Aminophenole wesentlich ausgeprägter mit Thiolelen reagierten als die entsprechenden ortho-Isomeren: wie 4-Dimethylaminophenol blockierte auch 4-Aminophenol eine nahezu äquivalente Menge an Hämoglobin-SH-Gruppen. Zugewetztes reduziertes Glutathion vermochte konkurrierend diese Bindung hierbei zu verhindern.

Ähnliches Verhalten zeigten die hier untersuchten ortho-Aminophenole in weit geringerem Ausmaß: nur in sehr niedrigen Konzentrationen addierten sie wie ihre para-Isomeren an Thiole (HbSH, GSH), die selbst dadurch vermindert wurden. Thiole waren auf die Ferrihämoglobinbildung durch ortho-Aminophenole weitgehend ohne Einfluß.

Bei 2-Aminophenol stand eine dem 2-Hydroxyphenetidin vergleichbare Kondensationsreaktion zu 2-Amino-3H-phenoxazin-3on im Vordergrund. Auch dieser Metabolit (rein dargestellt; durch Schmelzpunkt, UV/VIS-, IR-, NMR- und Massenspektren charakterisiert) bildete in geringem Umfaß selbst Ferrihämoglobin.

Das Ausmaß dieser Kondensationsreaktion verlief konzentrationsabhängig: bei Reaktion von 2 mM 2-Aminophenol wurden über 90% der theoretischen Phenoxazonmenge gebildet, jedoch wurde im μM -Bereich die Bildung dieses Metaboliten soweit zurückgedrängt, daß Additionsreaktionen mit Thiolen stattfanden, wie mit Hilfe von ^{14}C -

markiertem 2-Aminophenol (aus ^{14}C -Anilinhydrogensulfat synthetisiert) nachgewiesen wurde.

Offenbar war dabei eine Bindung an basische Aminosäuren (Lysin, Histidin) nachrangig, solange andere nukleophile Akzeptoren in ausreichender Menge verfügbar waren.

Speziesunterschiede, wie sie früher schon bei der Ferrihämoglobinbildung in Vollblut festgestellt wurden, fanden sich auch in gereinigter Hämoglobininlösung. Wahrscheinlich sind hierfür sterische Unterschiede in der Umgebung des Häms verantwortlich.

Die Kondensationsreaktionen der ortho-Aminophenole können die von einigen Autoren gefundenen Unterschiede in der Nephrotoxizität von ortho- und para-Aminophenolen erklären helfen:

Phenoxazonbildung, wie sie bei 2-Hydroxyphenetidin und 2-Aminophenol (in höheren Konzentrationen zu überwiegendem Anteil) erfolgt, verhindert kovalente Bindung an Proteine und Glutathionverarmung und erhält somit die Kapazität dieses Inaktivierungssystems. Die Selbstentgiftung reaktiver Metaboliten durch Phenoxazonbildung kommt bei niedrigen Konzentrationen jedoch nicht zum Tragen. Bei der Risikobeurteilung von Schwellendosen während Langzeitexposition sollte dieser Umstand mitberücksichtigt werden.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ANTONINI, E., and M. BRUNORI
Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands, p.114. In:
Frontiers of Biology, Vol. 21, (A. Neuberger and E.L. Tatum, eds.).
North-Holland Publishing Company, Amsterdam-London (1971)
2. ARCOS, J.C., and M. ARCOS
Molecular geometry and mechanisms of action of chemical carcinogens.
Fortschr. Arzneimittelforsch. (Hrgeb. E. Jucker), 4, 407-581 (1962)
3. BAADER, H., S. GIRGIS, M. KIESE, H. MENZEL und L. SKROBOT
Der Einfluß des Lebensalters auf Umsetzungen von Phenacetin, p-Phen-
etidin, N-Acetyl-p-aminophenol, p-Aminophenol und Anilin im Hunde.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exper. Path. u. Pharmakol., 241, 317-334
(1961)
4. BÄR, H., J. ZARNACK und S. PFEIFER
Phenoxazinone in Kulturlösungen von *Penicillium notatum* Westl.
Pharmazie, 26, 314 (1971)
5. BAMBERGER, E.
Über das Phenylhydroxylamin.
Chem. Ber., 27, 1552-1553 (1894)
6. BARTELS, H. und H. HARMS
Sauerstoffdissoziationskurven des Blutes von Säugetieren (Mensch, Ka-
ninchen, Meerschweinchen, Hund, Katze, Schwein, Rind und Schaf).
Pflügers Arch., 268, 334-365 (1959)
7. BELMAN, S., and W. TROLL
The interaction of 2-amino-1-naphthol with bovine serum albumin and
cytochrome c in relation to its effect on rat bladder.
J. Biol. Chem., 237, 746-750 (1962)

8. BONSER, G.M., D.B. CLAYSON, J.W. JULL, and L.N. PYRAH
The carcinogenic properties of 2-amino-1-naphthol hydrochloride and its parent amine 2-naphthylamine.
Br. J. Cancer, 6, 412-424 (1952)
9. BOOTH, J., and E. BOYLAND
The biochemistry of aromatic amines. 10. Enzymic N-hydroxylation of arylamines and conversion of arylhydroxylamines into o-amino-phenols.
Biochem. J., 91, 362-369 (1964)
10. BOYER, P.D.
Spectrophotometric study of the reaction of protein sulfhydryl groups with organic mercurials.
J. Am. Chem. Soc., 76, 4331-4337 (1954)
11. BOYLAND, E., and L.F. CHASSEAUD
The role of glutathione-S-transferase in mercapturic acid biosynthesis.
Adv. Enzymol., 32, 173-219 (1969)
12. BOYLAND, E., D. MANSON, and P. SIMS
The preparation of o-aminophenyl sulphates.
Chem. Soc., 3623-3628 (1953)
13. BÜCH, H., H. HÄUSER, K. PFLEGER und W. RÜDIGER
Bestimmung von Phenacetin und N-Acetyl-p-aminophenol über Stoffwechselprodukte im Harn.
Z. klin. Chem., 4, 288-290 (1966)
14. BÜCH, H., K. PFLEGER, W. RUMMEL, V. ULLRICH, D. HEY und H. STAUDINGER
Untersuchungen über den oxydativen Stoffwechsel des Phenacetins bei der Ratte.
Biochem. Pharmacol., 16, 2247-2256 (1967)

15. BUTENANDT, A., U. SCHIED, E. BIEKERT und P. KORNMANN
Ommochrome. I. Mitteilung. Isolierung von Xanthommatin, Rhodom-
matin und Ommatin C aus den Schlupfsekreten von *Vanessa*
urticae.
Liebigs Ann., 586, 217-228 (1954)

16. CALDER, I.C., C.C. FUNDER, C.R. GREEN, K.N. HAM, and
J.D. TANGE
Comparative nephrotoxicity of Aspirin and phenacetin derivatives.
Br. Med. J., 4, 518-521 (1971)

17. CASTRO, C.E.
Mechanisms of reaction of hemeproteins with oxygen and hydrogen
peroxide in the oxidation of organic substrates.
Xenobiotica, 10, 171-180 (1980)

18. CAVILL, G.W.K., P.S. CLEZY, J.R. TETAZ, and R.L. WERNER
The chemistry of mould metabolites - III. Structure of cinnabarin
(polystictin).
Tetrahedron, 5, 275-280 (1959)

19. CLAYSON, D.B.
A working hypothesis for the mode of carcinogenesis of aromatic
amines.
Br. J. Cancer, 7, 460-471 (1953)

20. CRAMER, J.W., J.A. MILLER, and E.C. MILLER
N-Hydroxylation: a new metabolic reaction observed in the rat with
the carcinogenic 2-acetylaminofluorene.
J. Biol. Chem., 235, 885-888 (1960)

21. CROWE, C.A., A.C. YONG, I.C. CALDER, K.N. HAM, and J.D. TANGE
The nephrotoxicity of p-aminophenol. I. The effect on microsomal
cytochromes, glutathione and covalent binding in kidney and
liver.
Chem.-Biol. Interact., 27, 235-243 (1979)

22. DIEPOLD, Chr., P. EYER, H. KAMPFFMEYER, and K. REINHARDT
Reactions of aromatic nitroso compounds with thiols.
In: Biological Reactive Intermediates II: Chemical Mechanisms and
Biological Effects.
(Snyder, R., D.V. Parke, J. Kocsis, D. Jollow and G.G. GIBSON eds.),
pp. 1173-1182.
Plenum Publishing Corporation, New York (1981)
23. DUBACH, U.C. und J. RAAFLAUB
Neue Aspekte der Nephrotoxizität von Phenacetin.
Experientia, 25, 956-958 (1969)
24. EYER, P.
Stoffwechsel und Wirkungen des 4-Dimethylaminophenols.
Habilitationsschrift, München (1975)
25. EYER, P.
Stoffwechsel und Wirkungen von 4-Dimethylaminophenol.
Fortschr. Med., 93, 1344 (1975)
26. EYER, P. and H. GABER
Biotransformation of 4-dimethylaminophenol in the dog.
Biochem. Pharmacol., 27, 2215-2221 (1978)
27. EYER, P., H. HERTLE, M. KIESE, and G. KLEIN
Kinetics of ferrihemoglobin formation by some reducing agents, and
the role of hydrogen peroxide.
Mol. Pharmacol., 11, 326-334 (1975)
28. EYER, P. und H. KAMPFFMEYER
Unveröffentlichte Ergebnisse (1980)
29. EYER, P., H. KAMPFFMEYER, H. MAISTER, and E. RÖSCH-OFHME
Biotransformation of nitrosobenzene, phenylhydroxylamine, and
aniline in the isolated perfused rat liver.
Xenobiotica, 10, 499-516 (1980)

30. EYER, P., and M. KIESE
Biotransformation of 4-dimethylaminophenol: Reaction with glutathione, and some properties of the reaction products.
Chem.-Biol. Interact., 14, 165-178 (1976)

31. EYER, P., M. KIESE, G. LIPOWSKY, and N. WEGER
Metabolisms of 4-dimethylaminophenol.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 270, R 29 (1971)

32. EYER, P., M. KIESE, G. LIPOWSKY, and N. WEGER
Reactions of 4-dimethylaminophenol with hemoglobin, and autoxidation of 4-dimethylaminophenol.
Chem.-Biol. Interact., 8, 41-59 (1974)

33. EYER, P., M. KIESE, and N. WEGER
The reaction of 4-dimethylaminophenol with hemoglobin.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 277, R 16 (1973)

34. FISCHBACH, T.
N-Hydroxyphenacetin: Darstellung, Biosynthese und Biotransformation.
Chem. Diplomarbeit, München (1975)

35. FISCHER, O. und O. JONAS
Beitrag zur Oxydation der aromatischen Orthodiamine und Orthoamidophenole.
Chem. Ber., 27, 2782-2785 (1894)

36. GABER, H.
Zum Mechanismus der autokatalytischen Ferrihämoglobinbildung durch Dimethylanilinoxid: Struktur, Wirkung und Biotransformation von 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol.
Naturwiss. Dissertation, München (1975)

37. GERBER, N.N.
Phenazines and phenoxazines from some novel Nocardiaceae.
Biochemistry, 5, 3824-3829 (1966)

38. GUTMANN, H.R., and H.T. NAGASAWA
The oxidation of o-aminophenols by cytochrome c and cytochrome oxidase, III. 2,3-Fluorenoquinonimine from 2-amino-3-fluoreno1 and binding of quinoid oxidation products to bovine serum albumine. J. Biol. Chem., 235, 3466-3471 (1960)
39. HADLER, H.J., and M.J. ERWIN
The conjugation of thiols by 2,6-dichloroindophenol. Biochemistry, 2, 954-957 (1963)
40. HENRICH, F. und F. SCHIERENBERG
Über Derivate des 2-Amido-5-äthoxyphenols. J. prakt. Chem., 70, 325-331 (1904)
41. HEUBNER, W.
14. Studien über Methämoglobinbildung. Dritte Mitteilung über den Zusammenhang zwischen chemischer Konstitution und Wirkung. Arch. f. exp. Path. u. Pharm., 72, 241-281 (1913)
42. HEUBNER, W.
Methämoglobinbildende Gifte. Ergebn. Physiol., 43, 9-56 (1940)
43. HEUBNER, W. und R. MEIER
32. Studien über Methämoglobinbildung. IV. Mitteilung. Arch. f. exp. Path. u. Pharm., 100, 137-161 (1923)
44. HINSBERG, O. und G. TREUPEL
Über die physiologische Wirkung des p-Aminophenols und einige Derivate desselben. Arch. f. exp. Path. u. Pharm., 33, 216-250 (1894)
45. HIROTA, K., and H.A. ITANO
Influence of ring substituents on the binding of nitrosobenzene by ferrihemoglobin. J. Biol. Chem., 253, 3477-3481 (1978)

46. HORSPOOL, W.M., P.I. SMITH, and J.M. TEDDER
The chemistry of ortho-benzoquinones. Part IV. Addition of primary aromatic amines to 1,2-benzoquinone.
J. Chem. Soc. (C), 138-140 (1971)
47. HUISGEN, R., F. BAYERLEIN und W. HEYDKAMP
Die Acylierung der N,N-Dimethylarylaminoxide; der Mechanismus der Polonovski-Reaktion.
Chem. Ber., 92, 3223-3241 (1959)
48. HUISGEN, R., W. HEYDKAMP und F. BAYERLEIN
Zur Reaktion der N,N-Dimethylarylamine mit Diacylperoxiden; der Mechanismus der Entmethylierung.
Chem. Ber., 93, 363-374 (1960)
49. KAMPEN, E.J. van, and W.G. ZIJLSTRA
Standardization of hemoglobinometry. II. The hemoglobincyanide method.
Clin. Chim. Acta, 6, 538-544 (1961)
50. KAMPPFMEYER, H.G.
On aminophenazone metabolism in the isolated perfused rat liver.
Eur. J. Drug Metab. Pharmacol., 1, 182-187 (1976)
51. KATZ, E., and H. WEISSBACH
Biosynthesis of the Actinomycin chromophore; enzymatic conversion of 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid to Actinocin.
J. Biol. Chem., 237, 882-886 (1961)
52. KIESE, M.
Oxidation von Anilin zu Nitrosobenzol im Hunde.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exper. Path. u. Pharmacol., 235, 354-359 (1959)
53. KIESE, M.
Methemoglobinemia: A comprehensive treatise.
CRC Press, Cleveland (1974)

54. KIESE, M., and M. PEKIS

The reaction of p-aminophenol with hemoglobin and oxygen in vivo and in vitro.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. exper. Path. u. Pharmakol., 246, 413-420 (1964)

55. KIESE, M., and M. RACHOR

The reaction of several aminophenols with hemoglobin and oxygen in vitro and in vivo.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. exper. Path. u. Pharmakol., 249, 225-236 (1964)

56. KIESE, M., and E. RAUSCHER

The failure of some aromatic amines to produce hemoglobin in vivo in spite of microsomal N-hydroxylation.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. exper. Path. u. Pharmakol., 251, 201-211 (1965)

57. KIESE, M., D. REINWEIN und H. WALLER

Die Hämoglobinbildung durch Phenylhydroxylamin und Nitrosobenzol in roten Zellen in vitro.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. exper. Path. u. Pharmakol., 210, 393-398 (1950)

57. KIESE, M., D. REINWEIN und H. WALLER

Die Hämoglobinbildung durch Phenylhydroxylamin und Nitrosobenzol in roten Zellen in vitro.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. exper. Path. u. Pharmakol., 210, 393-398 (1950)

58. KIESE, M., C. SCHNEIDER und H.-D. WALLER

Hämoglobinreduktase.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. exper. Path. u. Pharmakol., 231, 158-169 (1957)

59. KIESE, M., and N. WEGER

The treatment of cyanide poisoning by hemoglobin formation.

Arch. Toxicol., 21, 89-100 (1965)

60. KIESE, M., and N. WEGER

Formation of ferrihemoglobin with aminophenols in the human for the treatment of cyanide poisoning.

Eur. J. Pharmacol., 7, 97-105 (1969)

61. KING, C.M., S.F. CHANG, and H.R. GUTMANN

The oxidation of o-aminophenols by cytochrome c and cytochrome oxidase, V. Inactivation of catalase and arginase by 2-imino-1,2-fluorenoquinone.

J. Biol. Chem., 238, 2206-2212 (1963)

62. KING, C.M., H.R. GUTMANN, and S.F. CHANG

The oxidation of o-aminophenols by cytochrome c and cytochrome oxidase, IV. Interaction of 2-imino-1,2-fluorenoquinone and 2-imino-2,3-fluorenoquinone with bovine serum albumine.

J. Biol. Chem., 238, 2199-2205 (1963)

63. KING, C.M., and E. KRIEG

The differential reactivity of the oxidation products of o-aminophenols towards protein and nucleic acid.

Biochim. Biophys. Acta, 111, 147-153 (1965)

64. LESTER, D.

Formation of methemoglobin. I. Species differences with acetanilide and acetophenetidine.

J. Pharmacol. Exp. Ther., 77, 154-159 (1943)

65. LESTER, D.

Formation of methemoglobin. II. Repeated administration of acetanilide and acetophenetidine.

J. Pharmacol. Exp. Ther., 77, 160-164 (1943)

66. MARSH, J.P., Jr., and L. GOODMAN

Substitution reactions of the 2-aminophenoxaz-3-one system.

J. Org. Chem., 31, 3694-3698 (1966)

67. MITCHELL, J.R., D.J. JOLLOW, W.Z. POTTER, J.R. GILLETTE, and B.B. BRODIE
Acetaminophen-induced hepatic necrosis, IV. Protective role of glutathione.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 187, 211-217 (1973)
68. MUSSO, H., D. DÖPP und J. KUHLS
Phenoxazine, VIII. Über den Mechanismus der Kehrman'schen Phenoxazonsynthese. IR-spektroskopische Studien an isotopen Triphen-dioxazinen.
Chem. Ber., 98, 3937-3951 (1965)
69. MUSSO, H. und H.-G. MATTHIES
Über Orceinfarbstoffe, V. IR- und UV-Spektren Hydroxy- und Amino-substituierter Phenoxazone.
Chem. Ber., 90, 1814-1827 (1957)
70. MUSSO, H., K. SPAUKE und K.R. WALTER
Phenoxazine, X. Zur Zuordnung charakteristischer Banden im IR-Spektrum von Phenoxazonen-(3).
Chem. Ber., 100, 1436-1441 (1967)
71. NAGASAWA, H.T., and H.R. GUTMANN
The oxidation of o-aminophenols by cytochrome c and cytochrome oxidase, I. Enzymatic oxidations and binding of oxidation products to bovine serum albumine.
J. Biol. Chem., 234, 1593-1599 (1959)
72. NAGASAWA, H.T., and H.R. GUTMANN, and M.A. MORGAN
The oxidation of o-aminophenols by cytochrome c and cytochrome oxidase, II. Synthesis and identification of oxidation products.
J. Biol. Chem., 234, 1600-1604 (1959)
73. NAGASAWA, H.T., M.A. MORGAN, and H.R. GUTMANN
The enzymic oxidation of o-aminophenols.
Biochim. Biophys. Acta., 28, 665-666 (1958)

74. NAIR, P.M., and C.S. VAIDYANATHAN
Isophenoxazine synthase.
Biochim. Biophys. Acta, 81, 507-516 (1964)
75. NAMKUNG, M.J., and T.L. FLETCHER
Improved synthesis of 2-hydroxy-p-phenetidine and derivatives.
J. Med. Chem., 12, 348 (1969)
76. NEISH, W.J.P.
Lack of correlation between the methaemoglobinogenic activity
of azo dyes and their carcinogenicity.
Naturwissenschaften, 46, 535 (1959)
77. PFEIFER, S., H. BÄR und J. ZARNACK
Über Stoffwechselprodukte der Xanthocillin (Brevicid^R) bildenden
Mutante von Penicillium notatum Westl.
Pharmazie, 27, 536-542 (1972)
78. RAAFLAUB, J., and U.C. DUBACH
Dose-dependent change in the pattern of phenacetin metabolism in man
and its possible significance in analgesic nephropathy.
Klin. Wochenschr., 45, 1286-1287 (1969)
79. RACKER, E.
The metabolism of action of glyoxalase.
J. Biol. Chem., 190, 685-696 (1951)
80. RADOMSKI, J.L.
The primary aromatic amines: Their biological properties and
structure activity relationships.
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 19, 129-157 (1979)
81. RADOMSKI, J.L., and E. BRILL
The role of N-oxidation-products of aromatic amines in the induction
of bladder cancer in the dog.
Arch. Toxicol., 28, 159-175 (1971)

82. RALL, T.W., and A.L. LEHNINGER
Glutathione reductase of animal tissues.
J. Biol. Chem., 194, 119-130 (1952)
83. RISING, A.
Über die Methyl- und Aethyl-Aether des p-Oxyphenylhydroxylamins
und die daraus dargestellten Azoxyverbindungen.
Chem. Ber., 37, 42-47 (1904)
84. SCHÄFER, W.
The chemistry of the phenoxazones.
Prog. Org. Chem., 6, 136-163 (1964)
85. SCHÄFER, W. und I. GEYER
Über das Redoxverhalten der Ommochrome, UV/S-Spektren von 3H-Phen-
oxazinonen-(3) und Phenoxazinen.
Tetrahedron, 28, 5261-5279 (1972)
86. SHAHIDI, N.T.
Acetophenetidine-induced methemoglobinemia.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 151, 822-832 (1968)
87. SHAHIDI, N.T., and A. HEMAIDAN
Acetophenetidine-induced methemoglobinemia and its relation to the
excretion of diazotizable amines.
J. Lab. Clin. Med., 74, 581-585 (1969)
88. SHAHIDI, N.T., and I. TREICHEL
Mechanisms of acetophenetidine-induced hemolysis in glucose-6-phos-
phate dehydrogenase deficiency.
J. Clin. Invest., 46, 1116-1117 (1967)
89. SMITH, J.N., and R.T. WILLIAMS
The metabolism of p-phenetidine (p-ethoxyaniline) with some observa-
tions on the anisidines (methoxyanilines).
Biochem. J., 44, 250-255 (1949)

90. SUBBA RAO, P.V., and C.S. VAIDYANATHAN
Studies on the metabolism of o-aminophenol, purification and properties of isophenoxazine synthase from *Bauhenia monandra*.
Arch. Biochem. Biophys., 118, 388-394 (1967)
91. TEALE, F.W.J.
Cleavage of the haem-protein link by acid methylethylketone.
Biochim. Biophys. Acta, 35, 543 (1959)
92. UEHLEKE, H.
N-Hydroxylierung von p-Phenetidin in vivo und durch isolierte Mikrosomen aus Lebern und Nieren: Stimulierung durch Phenobarbital-Vorbehandlung.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak., 264, 434-461 (1969)
93. WEISBURGER, E.K.
Mechanisms of chemical carcinogenesis.
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 18, 395-415 (1978)
94. WIELAND, E., and H.G. NEUMANN
Methemoglobin formation and binding to blood constituents as indicators for the formation, availability and reactivity of activated metabolites derived from trans-4-aminostilbene and related aromatic amines.
Arch. Toxicol., 40, 17-35 (1978)
95. WILEY, F.H.
The metabolism of β -naphthylamine.
J. Biol. Chem., 124, 627-630 (1938)
96. WILL, W. und W. PUKALL
Zur Kenntnis des Aesculetins und einiger Derivate des Oxyhydrochinons.
Chem. Ber., 20, 1119-1136 (1887)

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Peter Eyer, danke ich sehr herzlich für die jederzeit gewährte Unterstützung, seine unzähligen wertvollen Ratschläge bei der Planung, Durchführung und Deutung der Experimente sowie die hervorragenden Arbeitsbedingungen in seiner Abteilung.

Frau I. Burow sowie Herrn Prof. Dr. W. Schäfer vom Max Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München, danke ich für die Aufnahme und Interpretation der Massenspektren.

Frl. G. Schild und Herrn Priv. Doz. Dr. J. Sonnenbichler vom Max Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München, verdanke ich die Aufnahme und Diskussion der NMR-Spektren.

Herrn Prof. Dr. G. Renner danke ich für die Überlassung von inaktivem wie auch von ^{14}C -markiertem 2-Dimethylaminophenol.

LEBENS LAUF

Klaus-Gustav Fritz ECKERT geboren am 28. 4. 1951 in Berlin-Nikolassee als Sohn des Chemikers Dr. Gustav Eckert und seiner Ehefrau Rosemarie, geb. Simon

1958 - 1962 Grundschule in Berlin-Wannsee

1962 - 1970 Staatl. Gymnasium Saarlouis

1970 Reifeprüfung

1970 - 1977 Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin

1971 Naturwissenschaftliche Vorprüfung

1973 Ärztliche Vorprüfung

1977 Staatsexamen

1977 - 1978 Medizinalassistentenzeit

Chirurgie: Krankenhaus Berlin-Wilmersdorf (Albr.-Achilles-Khs.),
Leiter: Prof. Dr. H.H. Kallenbach

Innere Medizin: Krankenhaus Berlin-Zehlendorf (Behring), I.Inn.Abt.,
Chefarzt: Prof. Dr. D. Lerche,
und
St. Vinzenz-Krankenhaus Pfronten,
Chefarzt: Dr. Wolfgang Lohse

29. 1. 1979 Approbation als Arzt

1979 Assistenzarzt am St. Vinzenz-Krankenhaus in Pfronten (Innere Med.)

Seit 1980 arbeite ich als Assistent von Herrn Prof. Dr.med. P. Eyer am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der Ludwig Maximilians-Universität München an der vorliegenden Dissertation.

